

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Medicina de Lisboa**



***STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ADQUIRIDO NA COMUNIDADE, EM  
IDADE PEDIÁTRICA: RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS,  
IMPORTÂNCIA DA LEUCOCIDINA DE PANTON-VALENTINE,  
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CORRELAÇÃO COM A CLÍNICA**

**Catarina Machado França Gouveia**

**Mestrado em Microbiologia Clínica**

**Dissertação orientada pelo Prof. Doutor Mário Ramirez**

Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nele apresentado



A impressão desta dissertação foi aprovada pela Comissão  
Coordenadora do Conselho Científico da Faculdade de Medicina de  
Lisboa em reunião de 26 de Janeiro de 2010



## **Prefácio**

Sou Pediatra e tenho especial interesse pela área da Infecçiology. Decidi fazer o mestrado em Microbiologia Clínica com a convicção de que, para além de ser útil para a minha formação, iria colmatar algumas deficiências básicas no âmbito da microbiologia. Dois anos passados, tanto o período curricular como o trabalho no laboratório foram uma experiência enriquecedora da qual não estou arrependida. Foi contudo fatigante! Acumular funções clínicas, com consultas, serviço de urgência e internamento, com o trabalho no laboratório e a vida familiar não foi tarefa fácil. Penso que não desisti por teimosia!

Não posso deixar de agradecer ao Professor Doutor Mário Ramirez pelo acompanhamento e apoio prestado, bem como a todos os colegas do laboratório de Microbiologia Clínica do Instituto de Medicina Molecular, em especial à Ana Friães pela disponibilidade e paciência que teve durante estes meses. Uma palavra especial para a Catarina Costa e Sandra Aguiar, cuja boa disposição tornaram o trabalho do laboratório mais fácil.

Por fim, os mais importantes, à minha mãe pelo estímulo e perfil sem o qual este mestrado não teria sido possível, ao meu pai pelo apoio, ao meu marido pela dedicação e aos meus filhos, Teresa, Manuel e João, que vão crescendo e aprendendo com o auxílio e ... com os trabalhos da mãe.



## Resumo

Nos últimos anos, tem-se assistido à emergência de estirpes de *Staphylococcus aureus* (SA) metilino-resistentes adquiridas na comunidade (SAMR-AC), associadas ou não, à produção da leucocidina de Pantón Valentine (LPV). A caracterização clínica e molecular das infecções por SA adquiridas na comunidade (SA-AC) não é conhecida em Portugal.

**Material e métodos:** Estudo retrospectivo e caso-controlo (doença invasiva vs. não invasiva) de crianças internadas no Hospital Dona Estefânia com o diagnóstico de infecção por SA-AC, de Janeiro de 2005 a Junho de 2008. Foi feita avaliação dos dados clínicos, determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos, detecção do gene *mecA* e LPV e caracterização por electroforese em campo pulsado (PFGE). Para as estirpes SAMR-AC foi realizado *spa typing*.

**Resultados:** Foram analisadas 70 estirpes, 35 isoladas de infecções invasivas (bacteriémia, infecção musculo-esquelética [IME] e pneumonias) e 35 isoladas de infecções da pele. Três estirpes (4,3%) eram resistentes à metilina (todas *mecA*-positivas), 9 (12,9%) à eritromicina e 5 (7,1%) à clindamicina. Dezasais (22,9%) eram portadoras de LPV.

Não se verificaram diferenças nas características demográficas, susceptibilidade aos antimicrobianos e perfil clonal por PFGE entre a população invasiva e não invasiva.

As estirpes de SAMR pertenciam a perfis clonais diferentes por PFGE e *spa type* (t008, t022 e t062), nenhuma era LPV positiva e estavam associadas a piomiosite.

As estirpes LPV positivas foram mais frequentes nas infecções da pele e apresentavam: menos frequentemente bacteriemia quando isoladas de infecções invasivas e um menor número médio de antibióticos nas IME.

**Conclusões:** . A resistência à meticilina foi baixa, sobreponível à de outros países da Europa. Não se encontrou relação entre a presença de LPV e a gravidade do quadro clínico, ao contrário do relatado na literatura. Entre as estirpes de SAMR-AC encontrou-se um clone *spa* t008, identificado em vários países da Europa e EUA em infecções da comunidade.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*; pediatria; infecção invasiva; resistência à meticilina; LPV.



## Abstract

**Introduction:** In the last years, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (SA) acquired in the community (SAMR-AC) has emerged, related or not with the carriage of Panton Valentine leukocidin (LPV). Limited data exists concerning clinical and molecular characteristics of community acquired SA infections in Portugal.

**Material and methods:** We performed a retrospective, case-control (invasive vs. non invasive disease) study of children admitted to Hospital Dona Estefânia, from January, 2005 through June 2008, with the diagnosis of SA-AC infection. Data on demographics, clinical aspects and antibiotics susceptibility were collected. Detection of *mecA* and LPV, pulse field electrophoresis (PFGE), and *spa typing* (only for SAMR) were done.

**Results:** Seventy isolates were characterised; all 35 from invasive disease (bacteraemia, bone, joint and muscle infections and pneumonia) and 35 from non invasive disease. Three (4,3%) strains were methicillin resistant, 9 (12,9%) erythromycin resistant and 5 (7,1%) clindamycin resistant. Sixteen (22,9%) harboured LPV genes.

No statistically significant differences were noted between the demographic characteristics, antibiotic susceptibilities and PFGE pattern between invasive and non-invasive populations.

SAMR strains had different clonal patterns by PFGE and *spa* type (t008, t022 e t062), none were LPV positive and were more frequently associated to pyomyositis.

Sixteen (22,9%) harboured LPV genes, mostly from non-invasive infections and with a history of trauma. Patients infected with LPV positive strains had mostly non-invasive infections and had: lesser bacteraemia in invasive infections; and were treated with fewer antibiotics in the bone and joint infections.

**Conclusions:** Methicillin resistance was low, as reported in other European countries, the LPV-carrying clones have been associated with more severe infections, specifically in the context of pneumonia or bone and joint infections. However, our data does not suggest that association.

One patient was infected with the strain *spa* t008, as reported in other European countries in community infections.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*; pediatrics; invasive infection; methicillin resistance; LPV.

# Índice

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Características morfológicas e estruturais .....	1
1.2 Epidemiologia.....	2
1.2.1 Colonização versus infecção .....	2
1.2.2 Transmissão .....	3
1.3 Defesas do hospedeiro .....	3
1.4 Fisiopatologia da doença estafilocócica .....	4
1.5 Manifestações Clínicas .....	6
1.6 Identificação laboratorial.....	8
1.7 Susceptibilidade antimicrobiana.....	8
1.7.1 Resistência à penicilina .....	9
1.7.2 Resistência à meticilina .....	9
1.7.3 Resistência a outros antimicrobianos .....	11
1.8 Resistência à meticilina na comunidade.....	11
1.9 Leucocidina de Panton-Valentine.....	14
1.10 Tipagem epidemiológica .....	14
2. OBJECTIVOS .....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Definições.....	20

3.2 Informação clínica .....	22
3.3 Isolamento e condições de crescimento.....	22
3.4 Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos .....	23
3.4.1 Difusão em agar.....	23
3.4.2 Determinação do fenotipo de resistência aos macrólidos.....	23
3.5 Extracção de ADN para amplificação por PCR .....	24
3.6 Detecção gene LPV .....	25
3.7 Detecção gene mecA .....	25
3.8 Electroforese de Campo Pulsado.....	26
3.9 Tipagem spa.....	28
3.10 Análise estatística .....	29
4. RESULTADOS .....	31
4.1 Características clínicas .....	31
4.2 Susceptibilidade aos antimicrobianos.....	38
4.3 Características SAMR e comparação SAMS .....	39
4.4 Análise clonal (PFGE e spa type).....	43
4.5 Leucocidina de Pantón Valentine .....	47
4.6 Situações clínicas específicas .....	51
4.6.1 Infecções músculo-esqueléticas.....	51
4.6.2. Infecção Pulmonar complicada .....	55

5. DISCUSSÃO .....	59
5.1 Características clínicas e epidemiológicas .....	59
5.2 Susceptibilidade antimicrobiana.....	63
5.3 Resistência à metilina .....	66
5.4 Análise clonal (PFGE e spa type).....	74
5.5 Leucocidina de Panton- Valentine.....	79
5.6 Situações clínicas especiais .....	84
6. CONCLUSÕES E PROPOSTAS .....	93
7. BIBLIOGRAFIA .....	96



# 1. INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* (SA) é uma bactéria oportunista que coloniza a pele de 20 a 30% da população, sendo capaz de causar uma multiplicidade de doenças no Homem (61, 81). É responsável por infecções ligeiras como impétigo ou abscessos cutâneos, e por doenças mais graves, nomeadamente bacteriémia, endocardite, pericardite, pneumonia, empiema, osteomielite, artrite séptica ou miosite (70).

## 1.1 Características morfológicas e estruturais

SA pertence ao género *Staphylococcus*, da família *Micrococcaceae* (133). Morfologicamente, apresenta-se como um coco gram-positivo, não esporulado, aeróbio ou anaeróbio facultativo. As células têm entre 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, esféricas, e são capazes de crescer num meio contendo cloreto de sódio a 10% e a temperaturas entre 18 a 40°C(69). *In vivo*, crescem formando pares ou cachos, o que determina a origem grega da designação (*staphylo* – cacho; *kokkus*-grão)(133).

Em gelose de sangue formam colónias redondas, convexas, brilhantes, opacas, com 1 a 4 mm de diâmetro. Neste meio é, em geral, observada uma zona de hemólise a envolver a colónia(69). A produção de pigmento é variável, exibindo usualmente um pigmento amarelo ou dourado(133).

SA segrega coagulase livre, que reage com o activador da coagulase no plasma, convertendo o fibrinogénio em fibrina, formando um coágulo de fibrina. Esta reacção pode ser utilizada para a identificação da espécie dentro do género *Staphylococcus*(61).

### 1.1.1 Estrutura

SA produz microcápsulas polissacáridas que parecem proteger a bactéria da interação com o complemento, anticorpos e células fagocíticas(75). A superfície bacteriana é constituída por três componentes principais, o peptidoglicano, o ácido teicóico e a proteína A (81). Produz uma grande variedade de produtos extracelulares, muitos dos quais com capacidade para provocar dano significativo no hospedeiro (61). Cerca de metade destas toxinas e genes de virulência estão distribuídos em ilhas de patogenicidade. Estes *clusters* genéticos contêm uma série de elementos genéticos, como transposões e integrases, que favorecem a transmissão. Alguns genes de virulência também podem estar localizados em prófagos(81).

## **1.2 Epidemiologia**

### **1.2.1 Colonização versus infecção**

O Homem constitui um reservatório natural para SA. Trinta a 50% dos adultos saudáveis são colonizados, sendo que 10 a 20% estão persistentemente colonizados. Mais recentemente, e por motivos desconhecidos, a taxa de colonização parece estar a aumentar(61). No Homem, o principal nicho ecológico é a parte interna e anterior das narinas (20% de colonização persistente e 30% intermitente), sendo também encontrada nas axilas, virilhas e aparelho digestivo(136). A colonização aumenta o risco de infecção, sendo a maioria dos doentes infectados pela estirpe colonizadora. Von Eiff *et al*, em doentes com bacteriémia, verificou que as estirpes isoladas do sangue eram idênticas em 82% dos casos às isoladas nas narinas(131). Contudo, o papel da



colonização na infecção é difícil de prever, uma vez que outros estudos sugerem o aumento da protecção contra a infecção nos doentes colonizados(81).

### **1.2.2 Transmissão**

SA pode ser transmitido de várias maneiras: por contacto com uma pessoa infectada (principal forma de transmissão); contacto com portadores assintomáticos ou objectos contaminados; ou por disseminação de aerossóis(81). Na transferência directa Homem a Homem, a exposição por mãos contaminadas parece ser mais importante do que a transmissão por colonização nasal.

SA é responsável por infecções esporádicas e surtos que variam de intra-familiares a intra-hospitalares prolongados(61). Em surtos familiares e em pequenas comunidades é frequente o aparecimento de múltiplos casos secundários meses após o caso inicial, sugerindo persistência da colonização(138).

## **1.3 Defesas do hospedeiro**

A pele e mucosas constituem a principal defesa contra a infecção por SA(61). Feridas, queimaduras e picadas insectos comprometem a defesa contra a infecção por SA. Igualmente os doentes com eczema atópico têm uma maior susceptibilidade à infecção por SA, o que poderá estar relacionado, para além da lesão da barreira cutânea, com um defeito nos níveis dos péptidos anti-bacterianos (beta-defensinas e catelicidinas), importantes para a imunidade inata da pele e para a alteração da resposta imune (68). Os corpos estranhos também favorecem a infecção por SA, nomeadamente próteses cardíacas, ortopédicas ou *shunts*. As infecções respiratórias virais, em particular por

influenza, ao lesar o epitélio respiratório e inibir o movimento dos cílios, predis põem para o desenvolvimento de infecção pulmonar por SA(61).

Após o estabelecimento da infecção a SA, os leucócitos polimorfonucleares têm um papel preponderante(61). Migram para o local da infecção, promovendo a internalização e morte intracelular da bactéria. Qualquer defeito na sua função promove a infecção, como bem evidenciado em doentes com síndrome de Job ou doença granulomatosa crónica, em que surgem infecções recorrentes por SA.

A importância da imunidade humoral e celular específica não parece ser tão evidente(61). A presença de opsoninas contra a cápsula, peptidoglicano ou complemento facilitam a fagocitose *in vitro*. Contudo, o papel *in vivo* é mais duvidoso uma vez que os títulos dos anticorpos contra SA não se correlacionam com a protecção da infecção, com excepção do Síndrome do choque tóxico(49).

## **1.4 Fisiopatologia da doença estafilocócica**

### **1.4.1 Factores de virulência**

Os factores de virulência têm um papel na adesão, persistência da infecção, evasão ao sistema imune, produção de enzimas e de factores que regulam a expressão proteica de modo a garantir a homeostasia(49).

As proteínas de superfície, designadas por *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs) parecem ter um papel fundamental na adesão. Estas proteínas ligam-se a moléculas como o colagéneo, fibronectina e

fibrinogénio, sendo determinantes nas fases iniciais de infecções osteo-articulares e endovasculares(106).

A capacidade de escapar ao sistema imune é também uma competência importante desta bactéria, produzindo microcápsulas antifagocíticas, ligando-se a imunoglobulinas (Proteína A) e segregando proteínas inibidoras da quimiotaxia dos neutrófilos(81). Para além disso, dispõe de leucocidinas, que causam destruição de leucócitos formando poros nas suas membranas.

Durante a infecção produz várias enzimas, como proteases, lipases e elastases, que permitem invadir e destruir os tecidos e migrar para outros órgãos(81). As hemolisinas têm actividade hemolítica e citotóxica, provocando dermonecrose e activação do sistema imune e da coagulação provocando choque. Os superantigénios ligam-se a regiões não variáveis do complexo *major* de histocompatibilidade (MHC) de classe II, produzindo uma tempestade de citocinas, causando um síndrome semelhante à *sepsis*. As toxinas epidermolisinas e esfoliatinas originam a síndrome da pele escaldada ou impetigo bolhoso(84).

A expressão destes factores de virulência não ocorre simultaneamente, mas sim de forma coordenada. Por exemplo, a expressão de MSCRAMMs ocorre na fase logarítmica, enquanto que a expressão das proteínas secretadas acontece na fase estacionária(49). O gene acessório regulador (*agr*) parece ter um papel crítico na regulação desta expressão, embora outros factores estejam implicados(49).

O papel destes factores na infecção é mais difícil de prever. Peacock *et al* investigou 334 estirpes de SA e verificou que sete determinantes (*fnbA*, *cna*, *sdrE*, *sej*, *eta*, *hlg* e *ica*) estavam associados à capacidade de causar infecção e que o seu efeito parecia ser

cumulativo(107). Pelo contrário, Diep *et al*, em estirpes de SA resistentes à meticilina (SAMR), verificou que cada tipo clonal apresentava um repertório de genes de virulência distinto e variável, não parecendo implicar um único factor como essencial para a virulência(28).

#### **1.4.2 Mecanismos de infecção**

SA provoca infecção por invasão directa dos tecidos com libertação de toxinas e posterior disseminação hematogénea. O abscesso estafilocócico é o protótipo da lesão estafilocócica(61). Para além da extensão local, a bactéria pode disseminar-se por via hematogénia a partir de qualquer foco de infecção. A bacteriémia estafilocócica pode ser complicada por endocardite, infecção metastática e *sepsis*.

### **1.5 Manifestações Clínicas**

As **infecções pele e tecido celular subcutâneo** (IP) incluem impétigo, foliculite, furúnculos, carbúnculos, infecções de feridas, abscessos e celulites(55, 133). São uma causa frequente de doença em crianças, correspondendo a cerca de 17% das consultas em ambulatório nos Estados Unidos da América (EUA)(55).

A celulite é uma infecção do tecido celular subcutâneo, de limites mal definidos, sem necrose ou supuração(133). Os sintomas mais frequentes são dor local e eritema, frequentemente associados a adenopatias regionais ou linfangite(60). A etiologia mais frequente é por *Streptococcus pyogenes* logo seguido por SA.

Os abscessos surgem geralmente após um traumatismo ligeiro e apresentam-se como uma colecção localizada de pus, com edema e eritema do tecido subcutâneo adjacente.

Acompanha-se por vezes de celulite, linfangite, adenopatias regionais e por vezes febre e leucocitose(55, 133). Uma outra forma de apresentação é a linfadenite aguda cervical.

Para além das IP, SA causa uma variedade de doenças invasivas. Nestes casos as estirpes são isoladas de locais habitualmente estéreis e a infecção localiza-se no osso ou articulação, músculo, pulmões ou pleura ou sangue.

A disseminação para a corrente sanguínea tem como consequência a *sepsis* ou complicações metastáticas, como osteomielite ou artrite séptica, sendo SA o agente mais frequentemente implicado(118). Tem sido referido um aumento da gravidade da doença invasiva, com um maior número de complicações nos últimos anos(31, 85).

A pneumonia estafilocócica é em geral rapidamente progressiva em todos os grupos etários. Em 1982 Charband *et al* descreveram 70 crianças com pneumonia a SA no Texas(21). A forma primária, por inoculação respiratória directa, é actualmente rara em países desenvolvidos. Afecta sobretudo crianças no primeiro ano de vida e a evolução radiológica é característica com derrame pleural em 70% dos casos, pneumotórax em 40% e pneumatocelos em 85%(56). A mortalidade atinge os 10%, com uma morbilidade superior(56). Actualmente, têm sido descritas novas formas de apresentação, como a pneumonia necrotizante, sobretudo associada à emergência de SAMR adquiridos na comunidade (SAMR-AC) e à produção da leucocidina de Pantón Valentine (LPV), com uma mortalidade superior(44).

A infecção pulmonar metastática, por disseminação hematogénica, parece ser mais frequente(21). É geralmente bilateral e multifocal, sendo o derrame pleural comum. Tem sido encontrada em crianças com formas graves de infecções estafilocócicas focais(118).

## **1.6 Identificação laboratorial**

A identificação por rotina de SA pode ser feita com base no teste da coagulase em tubo ou por aglutinação em látex(4). Os sistemas automatizados também podem ser utilizados para a identificação da espécie(69). A utilização de técnicas moleculares poderá ser útil para identificação rápida de SA metilino-resistente (SAMR) nos locais onde a resistência à metilina é elevada através da detecção do gene *mecA* por reacção em cadeia da polimerase (PCR)(4).

A utilização de um disco de cefoxitina pelo método de difusão em agar parece apresentar uma boa correlação com a resistência à metilina mediada pelo gene *mecA*, com excelente sensibilidade (98%) e especificidade (100%)(127). Estes resultados parecem ser equivalentes aos dados pelo método de microdiluição, razão pela qual o *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) recomenda a sua utilização(101).

## **1.7 Susceptibilidade antimicrobiana**

No início da década de 70, com a emergência de estirpes resistentes, tornou-se claro que nem todas as infecções bacterianas poderiam ser tratadas eficazmente por antimicrobianos. Nas infecções por SA este aspecto é especialmente preocupante, uma vez que se associa um elevado potencial de virulência a uma capacidade de resistir a múltiplos antimicrobianos. De facto, a emergência de resistência à penicilina, à metilina e a outros agentes tem comprometido a eficácia terapêutica nas infecções por SA(80).

### 1.7.1 Resistência à penicilina

Na década de 40 a penicilina começou a ser administrada, melhorando radicalmente o prognóstico dos doentes com infecção por SA. Contudo, logo em 1942 foram detectadas as primeiras estirpes resistentes. Desde 1960 que mais de 80% dos SA isolados da comunidade e hospitalares são resistentes à penicilina(19). A resistência é muitas vezes conferida por um gene (*blaZ*) que codifica uma  $\beta$ -lactamase e que hidrolisa o anel  $\beta$ -lactâmico, tornando-o inactivo. Este gene está localizado num plasmídeo, muitas vezes associado a outros genes de resistência adicionais(80).

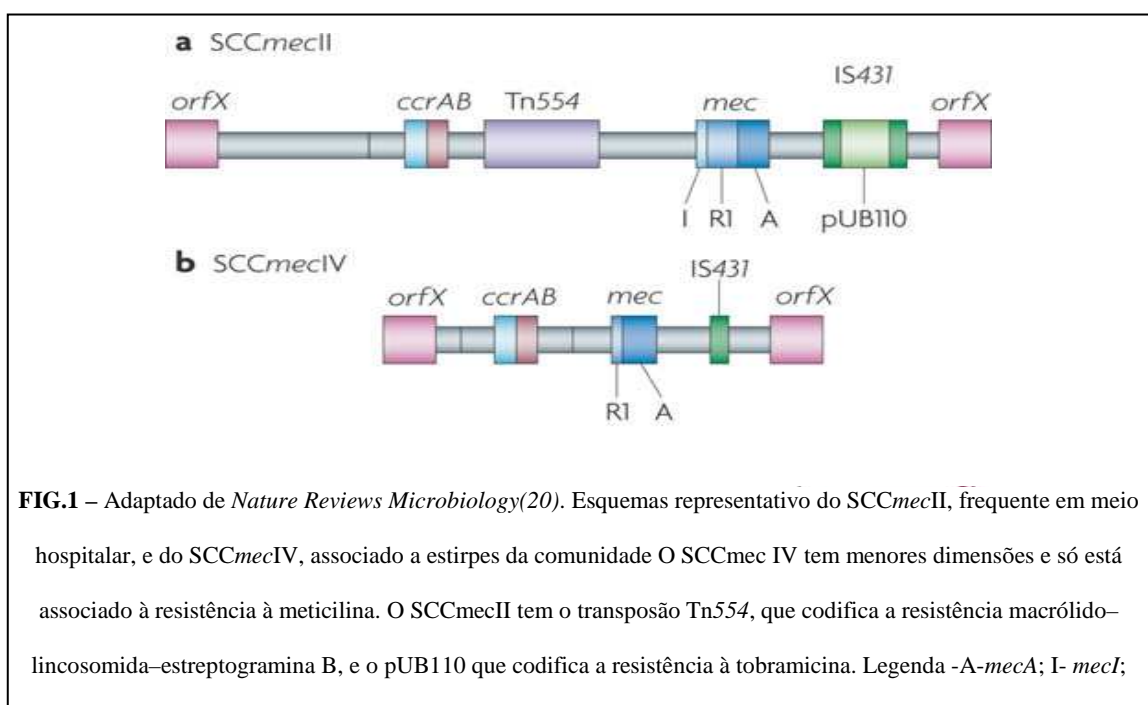
### 1.7.2 Resistência à meticilina

A meticilina, a primeira penicilina semi-sintética resistente às  $\beta$ -lactamases, foi introduzida em 1961. Imediatamente após a sua introdução surgiram as primeiras descrições de resistência, sendo que nas últimas quatro décadas se tem assistido a uma epidemia global de SAMR(19). Tal como as estirpes resistentes à penicilina, também as estirpes SAMR frequentemente transportam genes de resistência para outros antimicrobianos(4).

O gene *mecA*, responsável pela resistência à meticilina, faz parte de uma ilha genética denominada *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec). Este gene é responsável pela síntese da proteína de ligação à penicilina 2a (PLP2a), implicada na síntese do peptidoglicano, que apresenta uma baixa afinidade para a penicilina. A PLP2a consegue manter a reacção de transpeptidação na presença de elevadas concentrações de qualquer  $\beta$ -lactâmico, conferindo resistência a este grupo antimicrobiano(8).

Contudo, a expressão fenotípica da resistência à meticilina é variável, não existindo ainda um modelo genético satisfatório que explique esta expressão heterogénea(27). Efectivamente, nem todos os clones bacterianos que transportam *mecA* são resistentes à meticilina, pois os níveis de resistência dependem em parte da produção eficiente de PLP2a, modulada por outros factores cromossómicos (*mecR1-mecI*, região promotora *mecA*)(8). Por outro lado, vários genes adicionais parecem estar implicados na expressão óptima de resistência à meticilina, como por exemplo os factores *fem/aux*, entre outros, o que poderá explicar estas variações(9).

Os polimorfismos genéticos dos complexos *mec* (gene *mecA*, elementos *mecI* e *mecR1*) e *ccr* permitem classificar o SCCmec em 5 alotipos designados de I a V(102) (FIG.1).



O aparecimento simultâneo em diferentes áreas geográficas de estirpes SCCmec tipo IV, de menor tamanho, poderá reflectir a sua maior mobilidade e múltiplas transmissões simultâneas de outros *Staphylococcus* coagulase negativos.



### **1.7.3 Resistência a outros antimicrobianos**

As estirpes que circulam na comunidade raramente são resistentes a outros antimicrobianos, com exceção da eritromicina e clindamicina, cujos perfis de susceptibilidade diferem consoante a localização geográfica(65).

A eritromicina e a clindamicina representam duas classes diferentes de agentes antimicrobianos que inibem a síntese proteica por ligação à subunidade 50S do ribossoma bacteriano. Em SA a resistência a ambos pode ocorrer por metilação do alvo ribossômico sendo mediada pelo gene *erm*(127). Este mecanismo, também denominado resistência macrólido-lincosamidas-estreptogramina B (MLS<sub>B</sub>), pode ser constitutivo, resultando na produção mantida da rRNA metilase, ou indutível (iMLS<sub>B</sub>), em que a metilase é produzida só na presença de agentes indutores(127). A eritromicina parece ser um forte indutor e a clindamicina, um indutor fraco. Outras formas de resistência são a modificação enzimática, mediadas pelo gene *ereA* e *ereB*, e o efluxo, mediado pelo gene *msrA* e *msrB*(73). As estirpes de SAMS são, em geral, vinte vezes mais susceptíveis à eritromicina que as de SAMR(120)

Nas estirpes resistentes à eritromicina, é fundamental distinguir estes fenótipos, através do teste de difusão em agar, em que os discos de eritromicina e clindamicina são colocados lado a lado, distanciados de 15 a 20mm(101).

## **1.8 Resistência à meticilina na comunidade**

SAMR-AC foi identificado pela primeira vez em 1995, em aborígenes australianos(82). Nos últimos 10 anos têm sido isolados SAMR-AC em todo o mundo, em particular nos

Estados Unidos da América (EUA), Austrália e Europa, sobretudo na população pediátrica e em doentes sem factores de risco conhecido(19, 67).

Nos EUA, a prevalência de SAMR-AC varia entre 1 a 19%, atingindo os 76% no Texas(67) e na Europa varia entre 0,4 a 1%(110). Em Portugal, foi já identificado um clone de SAMR-AC isolado da orofaringe, em 1% da população saudável(113). Aires de Sousa identificou 13 estirpes SAMR-AC portadoras de SCCmec tipo IV em Portugal, uma delas portadora do gene LPV(3).

A terminologia relativa à infecção por SAMR com origem na comunidade é confusa e inconsistente(91). A maioria prefere o termo “associada à comunidade”, em relação aos termos “adquirida na comunidade” ou “com início na comunidade”, uma vez que o primeiro descreve o local onde a infecção ocorreu(91). Para além da terminologia, a definição também não é consensual(91, 135). São geralmente utilizados critérios epidemiológicos e moleculares para distinguir SAMR-AC de SAMR adquiridos em meio hospitalar (SAMR-AH). Segundo o CDC, considera-se SAMR-AC quando isolado em doentes sem factores de risco conhecidos, nomeadamente sem história prévia de infecção ou colonização por SAMR, e em que as culturas foram obtidas nas primeiras 48 horas de internamento ou em regime de ambulatório(53). Para além disso, são critérios de exclusão, a hospitalização no ano precedente, com excepção dos recém-nascidos, residência num centro de cuidados continuados ou outros factores de risco, como ter um acesso venoso central. Já foram utilizadas outras definições menos abrangentes o que dificulta comparações(92).

Para além dos critérios epidemiológicos, também as características moleculares das estirpes são diferentes das hospitalares. Tipicamente SAMR-AC são portadores de

SCCmec tipo IV (ou ocasionalmente V) que, por serem mais pequenos, não representam um grande custo adicional sendo facilmente transportados (FIG.1)(77). Parecem ter genes de virulência adicionais, como o LPV, *sea*, *seb*, *sec*, *seh* e *sek*, embora de forma variável, e um padrão distinto de *agr* (130),(32, 54). Para além disso, apresentam menor resistência aos antimicrobianos, sendo frequentemente susceptíveis a antimicrobianos não  $\beta$ -lactâmicos, incluindo o trimetoprim- sulfametoxazol (TMP-SMX), clindamicina e tetraciclina(54).

No entanto, actualmente os critérios moleculares estão a tornar-se obsoletos uma vez que se começaram a encontrar estirpes nosocomiais portadoras do SCCmec tipo IV e estirpes da comunidade com SCCmec tipo II e não tipáveis e com variações consideráveis na prevalência de diferentes tipos *agr*(91). Com a desadequação da definição molecular e a imperfeição da definição epidemiológica é difícil perceber a prevalência exacta de SAMR-AC que varia de forma drástica consoante as definições utilizadas.

O espectro clínico das infecções por SAMR-AC é semelhante aos de SA meticilino-sensível adquirido na comunidade (SAMS-AC), com um claro predomínio das infecções cutâneas(19, 61). Contudo, o número de doenças invasivas por SAMR-AC tem aumentado significativamente, principalmente nos EUA, já com vários casos descritos também em França, Reino Unido e países nórdicos(99, 119). Tal como nos EUA, Austrália e alguns países da Europa, é provável que nos próximos anos se assista a um aumento deste tipo de infecções em Portugal.

## **1.9 Leucocidina de Panton-Valentine**

A LPV foi descrita pela primeira vez em 1932 por Panton e Valentine. É uma citotoxina que pertence à família das toxinas sinergohimenotropicas. Estas toxinas lesam a membrana dos leucócitos pela acção sinérgica de dois polipéptidos, *LukS-PV* e *LukF-PV*, que interferem com a membrana fosfolipídica causando despolarização, aumento da permeabilidade, morte e lise celular (79, 109). No entanto, o papel exacto da LPV na infecção por SA continua por determinar.

Dufour *et al*, em França, detectou estirpes portadoras de LPV em 14% dos 593 isolados clínicos, a maioria SAMS, verificando que estava ausente nas estirpes SAMR-HA e presentes nas 14 estirpes de SAMR-AC avaliadas(32). Holmes *et al*, no Reino Unido, identificou a expressão de LPV em 2% dos isolados, a maioria SAMS(58). No Canadá, EUA e Austrália a prevalência parece ser superior e mais frequentemente associada às estirpes SAMR-AC(67).

As estirpes produtoras LPV têm sido associadas a infecções de pele, pneumonias necrotizantes e infecções musculo-esqueléticas mais graves do que é habitual(31, 44, 79, 85). A possível relevância da LPV como factor de virulência e a ausência de dados Portugal levou-nos a investigar este assunto.

## **1.10 Tipagem epidemiológica**

A tipagem molecular revolucionou o campo da epidemiologia das doenças infecciosas. Actualmente, a electroforese de campo pulsado (*pulse field electrophoresis*-PFGE), as técnicas de tipagem baseadas na sequenciação do ADN (*spa typing* e *Multilocus*

*sequence typing*-MLST) e a tipagem *SCCmec* têm sido as mais aplicadas(35, 36). A escolha do método deve depender dos objectivos do estudo, custo, tipo de estudo e da capacidade do laboratório(2, 36).

Desde 1990 que a técnica de PFGE se tornou o método de eleição provando ser reprodutível e segura com um elevado poder discriminatório(36, 128). No entanto, a multiplicidade de protocolos de PFGE publicados nos últimos anos tornam a reprodutibilidade inter-laboratorial um objectivo difícil de atingir pelo que tem sido proposta a utilização de um procedimento uniforme(22, 88, 96). Nos EUA, o CDC publicou um método que permite uma designação comum dos principais clones circulantes(88). Na Europa, o projecto HARMONY tentou uniformizar as diferentes técnicas. No entanto, o receio de que um protocolo *standard* resultasse numa menor discriminação das estirpes nacionais dificulta a aceitação(96).

Na tipagem por MLST, fragmentos internos de sete genes conservados são amplificados por PCR, sequenciados e comparados com uma base de dados disponível na internet ([www.mlst.net](http://www.mlst.net))(34).

O *spa typing* foi desenvolvido com base na sequenciação da região polimórfica X do gene da proteína A(123). Este método tem algumas vantagens em relação ao PFGE nomeadamente de rapidez, interpretação, comparação e codificação dos resultados(36). Contudo, a sua principal limitação relaciona-se com o facto de se restringir a um único fragmento interno de um gene(52).

A tipagem *SCCmec* é um método de PCR *multiplex* descrito por Oliveira *et al*(89, 102). A maioria das estirpes de SAMR-HA são *SCCmec* tipo I, II ou III enquanto as SAMR-AC transportam geralmente o tipo IV(35, 130).

Enright *et al* propôs que os clones SA sejam designados consoante a tipagem MLST e SCCmec(35). Considerando o custo/benefício, esta combinação parece ser a melhor escolha para as estirpes SAMR, com uma elevada congruência com o complexo clonal definido por eBURST(37). No entanto, uma vez que a tipagem *SCCmec* só se aplica para as estirpes *mecA* positivas, a combinação PFGE-*spa typing* parece ser uma melhor opção. A elevada congruência entre o *spa typing* e o PFGE nas estirpes SAMS torna contudo os dois métodos redundantes nestas estirpes(36).

As estirpes de SAMS parecem ter uma estrutura genética muito mais diversificada do que as estirpes de SAMR, o que sugere que as estirpes de SAMR-HA evoluíram de um número limitado de ancestrais meticilino sensíveis(1). De facto, as estirpes de SAMR-HA pertencem a 5 complexos clonais (CCs) diferentes, designados por CC5, CC8, CC22, CC30 E CC45(35). Destes, o CC5 e o CC8 são responsáveis pela maioria dos surtos hospitalares em todo o mundo. Exemplos de clones disseminados a nível hospitalar são EMRSA15 (ST22), EMRSA16 (ST36-II), o clone arcaico (ST250-I OU 247-I), Pediátrico (ST5-IV) ou Brasileiro (ST-239-III)(1, 46). Pelo contrário, as estirpes SAMR-AC são diferentes das hospitalares, não parecendo ter a mesma origem genética. Estão descritos três tipos predominantes de SAMR-AC, nomeadamente ST-1, nos EUA, ST-30 no Pacífico e ST-80 na Europa (130). A razão para o aparecimento destes clones e o aparente aumento de virulência é desconhecido.

## 2. OBJECTIVOS

A caracterização das infecções por SA adquiridas na comunidade é limitada, sobretudo a referente às estirpes de SAMS(61). Em Portugal, os dados relativos aos SAMR-HA são extensos e amplamente conhecidos(1). Contudo, a maioria das infecções invasivas por SA continuam a ser por estirpes SAMS, mesmo em países onde a prevalência de resistência à meticilina é muito elevada, tendo uma gravidade e mortalidade bastante superiores no geral(87). Em Portugal, não existe ainda qualquer estudo que analise a prevalência e relacione as características clínicas com as moleculares neste tipo de infecção. A crescente importância clínica atribuída a SAMR-AC e à LPV justificam também a sua caracterização. Assim sendo, os objectivos deste estudo foram os seguintes:

- Definir as estirpes de SA-AC responsáveis por infecções invasivas e não invasivas numa população pediátrica e correlacioná-las com os dados clínicos encontrados;
- Caracterizar genotipicamente as estirpes de SA-AC através da metodologias de PFGE (e tipagem Spa para as estirpes SAMR), para avaliar a diversidade clonal desta população;
- Verificar se existe uma associação entre o tipo clonal, a capacidade invasiva da bactéria e a susceptibilidade antimicrobiana;
- Averiguar a relação clonal entre as estirpes SAMR e SAMS e entre as estirpes LPV positivas e negativas, nas infecções invasivas e nas infecções não invasivas, em geral, e nas pneumonias e nas osteomielites, em particular.





### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Estudo de casos e controlos, retrospectivo, de crianças e adolescentes internadas no Hospital Dona Estefânia com o diagnóstico de infecção por SA. Foram escolhidos todas as estirpes isoladas de infecções invasivas a SA (coorte com doença invasiva) e emparelhado com um coorte de doentes com IP.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital Dona Estefânia. Não foi considerado necessário consentimento informado.

O Hospital Dona Estefânia é um hospital pediátrico terciário, com 206 camas, 10 Enfermarias e 2 Unidades de Cuidados Intensivos, cuja área de influência abrange 23 freguesias no Concelho de Lisboa e oito freguesias no Concelho de Loures, sendo também hospital de referência para outras Unidades de Saúde, nomeadamente do Sul do País, das Regiões Autónomas e ainda de Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa.

Foram identificadas 1370 (287 em 2005; 454 em 2006; 426 em 2007 e 203 na primeira metade de 2008) estirpes de SA isoladas no laboratório de microbiologia do Hospital Dona Estefânia num período de 3,5 anos (Janeiro de 2005 a Junho de 2008). Foram excluídas as amostras provenientes de infecção adquirida no hospital, as amostras obtidas do mesmo doente e as provenientes de locais não estéreis, com excepção dos exsudados de pele. Das 238 amostras provenientes de crianças e adolescentes internados com o diagnóstico de infecção por SA-AC, 167 estavam disponíveis para análise (a maioria de 2006 e 2007).

Foram estudadas setenta estirpes, todas as isoladas de doença invasiva (n=35) e emparelhadas com 35 provenientes de infecções cutâneas, escolhidas sucessivamente

(internadas imediatamente após o caso infecção invasiva). No Quadro I mostra os diferentes produtos biológicos das estirpes estudadas.

<b><i>Quadro I- Produtos biológicos de onde foram isolados SA</i></b>		
<b><i>Produto biológico</i></b>	<b><i>n</i></b>	<b><i>%</i></b>
<b>Sangue</b>	<b>18</b>	<b>25,7%</b>
<b>Líquido sinovial</b>	<b>5</b>	<b>7,1%</b>
<b>Líquido pleural</b>	<b>5</b>	<b>7,1%</b>
<b>Pus*</b>	<b>42</b>	<b>60%</b>

\*8 colhidos de modo asséptico (Bloco operatório)

Os testes de susceptibilidade das estirpes foram inicialmente feitos num sistema automatizado (bioMerieux, Vitek) no laboratório de microbiologia do Hospital Dona Estefânia. A caracterização fenotípica e genotípica foi realizada pela autora no Instituto de Medicina Molecular, da Faculdade de Medicina de Lisboa.

### **3.1 Definições**

Considerou-se infecção adquirida na comunidade quando o microrganismo foi isolado nas primeiras 48 horas de internamento em doente sem factores de risco conhecido, ou após as 48 horas, se a apresentação clínica foi compatível com infecção da comunidade e a cultura obtida mais tarde por aspectos inerentes aos procedimentos invasivos (ex. biopsia óssea)(53, 90). Foram excluídos os doentes com história prévia de infecção/ colonização por SAMR, hospitalizações ou residência em casas de saúde no ano anterior ao internamento (com excepção dos recém-nascidos), ou com outros factores de risco para SAMR-AC, como cirurgia, diálise ou acesso venoso central(53). Foram também excluídos doentes com patologia subjacente que predispõe a hospitalização

frequente (imunodeficiência, insuficiência renal, fibrose quística, neoplasia, entre outros).

Considerou-se infecção invasiva sempre que houve envolvimento de sangue, osso ou articulação, músculo, pulmões ou pleura, e as estirpes isoladas de produtos habitualmente estéreis. Nas infecções do osso, as estirpes isoladas de pus recolhido no bloco operatório (sob medidas rigorosas de assepsia) também foram consideradas invasivas. As restantes, obtidas por exsudados da pele, local onde é reconhecida a colonização por SA, ou por técnicas de colheita que não excluem a possibilidade de contaminação, foram consideradas como estirpes de infecção não invasiva.

A infecção do osso e articulação foi definida com base em critérios clínicos, imagiológicos e laboratoriais, segundo os critérios de Peltola *et al*(108). Definiu-se piomiosite como uma infecção bacteriana aguda do músculo-esquelético com formação de abscesso(105). Foram utilizados os critérios da Sociedade Americana de Cuidados Intensivos para definir *sepsis*(78).

Definiu-se pneumonia pela presença de sinais ou sintomas de infecção respiratória inferior e infiltrado pulmonar na radiografia não atribuível a outras causas. Foram atribuídos a SA, quando para além dos critérios clínicos de infecção pulmonar, se isolou a bactéria de derrame pleural ou abscesso pulmonar, lavado bronco-alveolar ( $>10^4$ cfu/ml) ou de hemocultura(44).

Sempre que foram isoladas várias estirpes de SA do mesmo doente, apenas uma foi seleccionada para análise, preferencialmente a isolada da hemocultura ou cultura directa do tecido infectado.

### **3.2 Informação clínica**

Dos doentes identificados foi colhida informação retrospectiva relativa a dados demográficos e clínicos, nomeadamente história prévia de traumatismo ou ferida cutânea, antibioticoterapia prévia, duração dos sintomas, dias de febre, sinais inflamatórios locais, alterações laboratoriais, locais de isolamento, dias de cultura positiva, terapêutica antimicrobiana (inicial, final e duração), intervenções cirúrgicas, duração do internamento, internamento em unidade de cuidados intensivos pediátricos (UCIP) e prognóstico. Nas crianças com infecções osteo-articulares, a localização, presença de abscessos, piomiosite, extensão local, fractura patológica, trombose venosa profunda e osteomielite crónica foi também avaliada. Nos doentes com pneumonia foram registados sinais de dificuldade respiratória, presença de hemoptises e aspectos radiográficos *major*.

### **3.3 Isolamento e condições de crescimento**

As características morfológicas das estirpes foram confirmadas visualmente após 24 horas de incubação à temperatura de 35 °C em atmosfera não controlada, em placas de *Tryptic Soy Agar* (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) suplementado com 5% (V/V) de sangue desfibrinado de carneiro (Probiológica, Belas, Portugal). Para armazenamento das estirpes a -80 °C, colónias com 24 horas de crescimento nas condições anteriormente descritas foram inoculadas em meio *Tryptic Soy Broth* (Difco Laboratories, Maryland, EUA) suplementado com 15% (V/V) glicerol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha).

### **3.4 Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos**

#### **3.4.1 Difusão em agar**

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi efectuada com discos contendo concentrações adequadas de antimicrobianos, por difusão em agar, de acordo com as normas do CLSI(101). Foram ensaiados os seguintes antimicrobianos: penicilina, oxacilina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, vancomicina, cotrimoxazol, cloranfenicol, gentamicina, ciprofloxacina, rifampicina.

Para a preparação do inóculo foram transferidas 1 a 2 colónias bacterianas, isoladas em meio gelose de sangue, para uma suspensão salina de NaCl 0,85%, de modo a obter uma turbidez da suspensão equivalente a 0,5 da escala de McFarland. O inóculo padronizado foi semeado na superfície de uma placa de meio Muller-Hinton (Biomérieux, L'Etoile, França) e foram aplicados os discos de papel de filtro contendo uma concentração definida do agente antimicrobiano em estudo, disponíveis comercialmente. A placa foi incubada a 35°C durante 18 horas. O diâmetro da zona de inibição à volta do disco foi medido e a interpretação dos resultados feita de acordo com os valores das concentrações críticas indicados pelo CLSI(101). A estirpe de controlo utilizada foi SA ATCC 25923.

#### **3.4.2 Determinação do fenótipo de resistência aos macrólidos**

A determinação do fenótipo de resistência aos macrólidos foi efectuada recorrendo a um método em que se coloca um disco de eritromicina (15µg) a cerca de 15-20mm de distância de um disco de clindamicina (2µg) à superfície de uma placa de Muller-Hinton

previamente inoculada com a estirpe em estudo (39, 101). Após 18 a 24 horas de incubação a 35°C, observam-se as zonas de inibição à volta dos dois discos. No fenotipo M há inibição de crescimento à volta do disco de eritromicina, sem interferência com o halo de inibição do disco de clindamicina. No fenotipo MLS<sub>B</sub> constitutivo (cMLS<sub>B</sub>) há ausência ou diminuição do halo em volta dos dois discos. No fenotipo MLS<sub>B</sub> indutível (iMLS<sub>B</sub>) há diminuição ou ausência do halo de inibição em redor do disco de eritromicina, com uma diminuição sectorial da zona de inibição em volta do disco de clindamicina na zona próxima ao disco de eritromicina. Para controlo de qualidade utilizou-se a estirpe de referência *S.aureus* ATCC 25923 (susceptível aos macrólidos e à eritromicina).

### **3.5 Extracção de ADN para amplificação por PCR**

O ADN alvo para as reacções de PCR foi preparado de acordo com o método anteriormente descrito (26). Com uma ansa de 10µL suspendearam-se 3-4 colónias da estirpe a testar em 49µL de tampão TE (1mM Tris [Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha], 0,5mM EDTA [Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha], pH 8) com 1 µL Lisostafina 10 mg/ml (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Esta suspensão foi incubada a 37° durante 30 minutos e aquecida a 95 °C durante 15 minutos. Foi adicionada 150 µL H<sub>2</sub>O e após centrifugação a 14000 rpm durante 5 minutos, foi removido o líquido sobrenadante. Os lisados celulares preparados deste modo foram armazenados a -20 °C até realizar a PCR.

### **3.6 Detecção gene LPV**

A detecção do gene LPV foi efectuada de acordo o método descrito por Lina *et al*(79). Um volume de 2µl de ADN alvo foi adicionado à mistura de PCR contendo: 10µl tampão de PCR 5X (Green buffer, Promega, Madison, Estados Unidos da América), 200µM desoxinucleótidos trifosfato (MBI Fermentas, Hanover, EUA), 20pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (LPV 1 e 2), 2,5mM de cloreto de magnésio, e 1,25 unidade de DNA polimerase GO Taq (Promega, Madison, EUA) num volume final de 50µl .

As condições de reacção para amplificação foram as seguintes: 94° durante 5 minutos, 25 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto, com um período de extensão final a 72°C durante 7 minutos. A reacção foi efectuada num termociclador “Biometra T gradient” (Goettingen, Alemanha) A visualização dos produtos de amplificação foi feita por electroforese em gel de agarose 1% (p/v) (BioRad, Richmond, EUA).

### **3.7 Detecção gene mecA**

A detecção do gene *mecA* foi efectuada de acordo o protocolo descrito por Milheiro *et al*(89). Um volume de 2µl de ADN alvo foi adicionado à mistura de PCR contendo 10µl tampão de PCR 5X (Green buffer, Promega, Madison, EUA), 200µM desoxiribonucleótidos trifosfato (MBI Fermentas, Hanover, EUA), 40pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (*mecA* P4, *mecA* P9), 2,5mM de cloreto de magnésio, e 1,25

unidade de *DNA polimerase GO Taq* (Promega, Madison, EUA) num volume final de 50µl.

As condições de reacção para amplificação foram as seguintes: 94° durante 4 minutos, 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 53°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto, com um período de extensão final a 72°C durante 4 minutos. A reacção foi efectuada num termociclador *Biometra T gradient* (Goettingen, Alemanha). A visualização dos produtos de amplificação foi feita por electroforese em gel de agarose 2% (p/v) (BioRad, Richmond, EUA).

### **3.8 Electroforese de Campo Pulsado**

A metodologia de PFGE foi efectuada de acordo com o descrito por Chung *et al*(22).

Para **preparação de discos de agarose** contendo o DNA cromossómico bacteriano procedeu-se do seguinte modo: inoculou-se uma colónia em 5mL de meio líquido *Todd-Hewitt* (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) e incubou-se a 37 °C no agitador durante a noite. A suspensão foi centrifugada a 14000 rpm durante 2 minutos. Após remoção do sobrenadante, as células foram lavadas com 500 µl de tampão PIV, novamente centrifugadas durante 2 minutos a 14000 rpm (centrífuga eppendorf 5417R) à temperatura ambiente. Em seguida ressuspenderam-se as células em 200 µl de tampão PIV a 4°C e a suspensão foi ajustada a uma densidade óptica a 620nm igual a 5.

Um volume de 150mL da suspensão celular foi equilibrado a 42 °C e adicionou-se igual volume de agarose de baixo ponto de fusão (BMA, Rockland, USA) a 1,5% (p/v) em tampão PIV (0,01M Tris pH 8,0, 1M NaCl) a 42°. Aliquotas de 20µL desta mistura



foram distribuídas sobre uma superfície de vidro e cobertas com uma lâmina. Após 5 minutos a -20 °C, os discos de agarose foram transferidos para um tubo contendo 1mL de solução de lise com tampão EC [0,01M Tris (pH 8,0), 1M NaCl, 0,1M EDTA (pH 7,5), 2% ácido deoxicólico, 5% n-lauroil-sarcosina, 5% Brij 58 (polioxietileno 20 cetil éter)] e 100µg/ml de lisozima (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), 50µg/ml de ribonuclease A (RNase A) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e 50µg/ml de lisoestafina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e incubados a 37 °C durante 3 a 5 horas.

A solução de lise foi substituída por solução contendo tampão ES (0,5M EDTA pH 9,0, 1% (m/V) n-lauroil-sarcosina) e 1mg/ml de proteinase K (Roche, Mannheim, Alemanha) e os discos foram colocados a incubar durante 17 horas a 50 °C. Após remoção da solução anterior, procedeu-se à lavagem dos discos deixando-os em 13mL de TE 1X (10mM Tris pH7,5, 1mM EDTA pH8,0) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido pelo menos cinco vezes. Os discos foram armazenados a 4 °C em TE 1X até realização da restrição.

A metodologia de digestão do ADN cromossômico foi feita com SmaI (Fermentas, Vilnius, Lituânia) ou com um isosquizómero- Cfr-9I (Fermentas, Vilnius, Lituânia) e a separação dos fragmentos gerados foi adaptada de um protocolo descrito anteriormente (22). Um disco foi equilibrado a 30 °C, em tampão recomendado para a enzima pelo fabricante, durante 1 hora. Após remoção do tampão, foi adicionado ao tubo com o disco, 45µL de solução de digestão contendo 7,5 unidades de SmaI, ou 20 µL de solução de digestão contendo 3,75 unidades de Cfr9I, em tampão Tango 1X (MBI Fermentas, Hanover, EUA), e a mistura foi incubada durante a noite a 30°C.

Os fragmentos de ADN cromossómico foram separados utilizando um gel de agarose a 1% (m/V) em tampão 0,5X TBE (Tris-borato-EDTA) (Bio-Rad, Munique, Alemanha), utilizado como tampão de separação. Como marcador de peso molecular utilizaram-se discos de *Lambda ladder PFGE marker* (New England Biolabs, Beverly, EUA).

Foi utilizado um aparelho de electroforese CHEF-DR III (Bio-Rad, Munique, Alemanha). As condições de separação foram as seguintes: pulso inicial, 5 segundos; pulso final, 35 segundos; voltagem de 6V/cm; tempo de separação, 23 horas e temperatura 14 °C. Após a separação o gel foi corado numa solução de 0,5 µg/ml de brometo de etídeo (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) durante a noite e fotografado utilizando o sistema EDAS 290 (Eastman Kodak Company, Nova Iorque, EUA).

Para a análise comparativa dos perfis de restrição obtidos utilizou-se o programa informático *Bionumerics* (Applied-Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Utilizando o coeficiente de Dice, com posições de optimização 1,0 e de tolerância de 1,5, respectivamente, construiu-se um dendograma pelo método UPGMA e considerou-se que as estirpes pertenciam ao mesmo clone de PFGE se tinham uma semelhança igual ou superior a 80%, como anteriormente descrito(88, 128).

### **3.9 Tipagem spa**

Nos SA isolados resistentes à meticilina foi feita a análise de polimorfismos da região X da proteína A (spa) como previamente descrito(123). A análise dos resultados foi feita no Ridom Spa Server(<http://spa.ridom.de/index.shtml>)

Procedeu-se à amplificação do gene que codifica a proteína A por PCR, purificação e sequenciação dos produtos de amplificação e identificação dos alelos obtidos.

O gene para a proteína A foi amplificado num volume de reacção de 50µL, contendo: 2µl de DNA alvo, 10µl tampão de PCR 5X (Buffer 5xs, Promega, Madison, EUA), 200µM desoxiribonucleótidos trifosfato (MBI Fermentas, Hanover, EUA), 10pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (spa1113f e spa1514), 2mM de cloreto de magnésio, e 1,25 unidade de DNA polimerase GO Taq (Promega, Madison, EUA).

As condições de reacção para amplificação foram as seguintes: 80° durante 5 minutos, 30 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 60°C durante 45 segundos e 72°C durante 130 segundos, com um período de extensão final a 72°C durante 10 minutos. A reacção foi efectuada num termociclador *Biometra T gradient* (Goettingen, Alemanha). A visualização dos produtos de amplificação foi feita por electroforese em gel de agarose 1% (p/v) (BioRad, Richmond, EUA). Foi utilizado *1Kb plus* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) como marcador de peso molecular. Após confirmação da presença de um único fragmento com o tamanho apropriado, os produtos de amplificação foram purificados utilizando o *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche, Mannheim, Alemanha). Os oligonucleotídeos usados na amplificação foram também utilizados como oligonucleotídeos iniciadores para a sequenciação do fragmento codificando parte da proteína A na Macrogen (Seul, Coreia do Sul).

### **3.10 Análise estatística**

Para as variáveis dicotómicas, utilizou-se o teste exacto de Fisher e para as contínuas, o teste de Mann-whitney. Foi utilizado o teste Q-quadrado para analisar tendências. Considerou-se significativo um  $p < 0,05$ . A probabilidade de ocorrência de alterações

demográficas, clínicas e laboratoriais na população invasiva e não invasiva foi determinada através do cálculo de *odds ratio* (OR), com um intervalo de confiança de 95%. A análise estatística foi efectuada nos programas informáticos SPSS para Windows (versão 16,0) e EPI info (versão 3.5.1;CDC). Foi utilizado o coeficiente de Wallace para avaliar a relação entre classificadores com base na página [www.comparingpartitions.info](http://www.comparingpartitions.info)(18).A análise dos dados foi feita para todos os doentes (população invasiva/não invasiva) e para o grupo das infecções musculo-esqueléticas em separado.

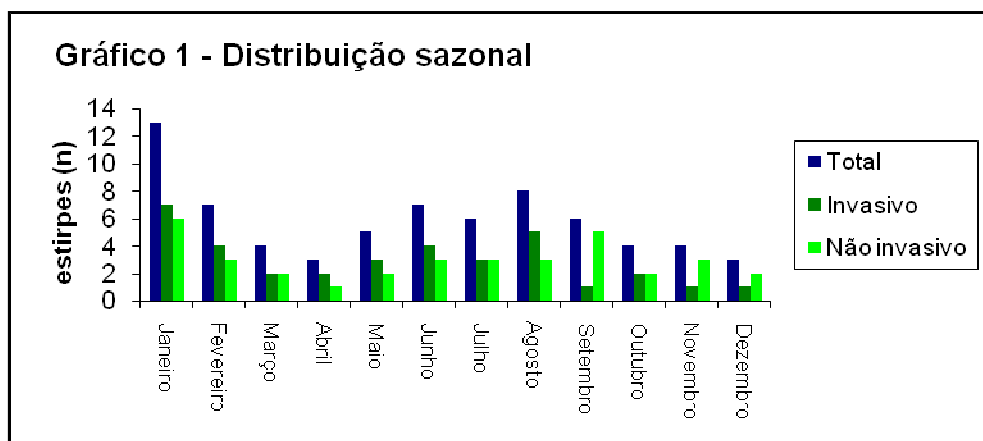
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Características clínicas

#### 4.1.1 Características demográficas e clínicas

Foram estudadas 70 estirpes, 35 de doença invasiva e 35 doença não invasiva. A idade variou entre os 23 dias e os 16 anos, sendo a mediana de  $3,1 \pm 4,9$  anos. Trinta e seis (51,4%) eram do sexo masculino e 13 (18,6%) de origem africana, sendo que em 20 (28,6%) a origem étnica não estava registada no processo.

A distribuição anual foi de 6 (8,6%) em 2005, 26 (37,1%) em 2006, 27 (38,6%) em 2007 e 11(15,7%) em 2008, não havendo correlação entre a distribuição anual e o número de casos de doença invasiva/não invasiva (correlação Spearman  $r=-0,06$ ). A distribuição mensal está representada no gráfico 1 com um ligeiro aumento em Janeiro e Agosto.



Em relação aos antecedentes, 7 referiam outra doença nomeadamente: eczema (n=4), hepatite B (n=1), catarata congénita (n=1) e queimadura ligeira há mais de 1 ano (n=1). Identificaram-se factores de risco em 47 (67,1%): 20 (28,6%) ferida cutânea, 5 (7,1%) traumatismo, 18 (25,7%) infecção viral prévia (10 varicela, 5 infecção respiratória viral e 3 outras infecção virais), 9 (12,9%) eram adolescentes e 10 (14,3%) recém-nascidos. Os diagnósticos principais por ano estão representados no quadro II.

<i><b>Quadro II- Diagnósticos principais durante nos 4 anos de estudo</b></i>					
<b>Diagnósticos clínicos</b>	<b>Total N=70</b>	<b>2005 N=6</b>	<b>2006 N=26</b>	<b>2007 N=27</b>	<b>2008* N=11</b>
<b>Bacteriemia/sepsis</b>	9 (12,8%)	1	2	3	3
<b>Infecção Osteoarticular</b>	20(28,6%)	2	7	8	3
<b>Pneumonia</b>	5 (7,1%)	0	3	2	0
<b>Piomiosite</b>	1 (2,9%)	0	0	1	0
<b>IP</b>	35 (50%)	3	14	13	5

\* De Janeiro a Junho de 2008

As características demográficas e a apresentação clínica inicial na população com doença invasiva e não invasiva estão representadas no quadro III, não se tendo verificado diferenças significativas entre as características demográficas da população invasiva e não invasiva. A frequência de febre foi semelhante nos dois grupos, sendo mais frequente a dor intensa e a bacteriémia na doença invasiva e a presença de sinais inflamatórios da pele na doença não invasiva.

Na **doença invasiva** a infecção foi aguda em todos os casos, com um intervalo médio entre o início dos sintomas e o internamento de 3 dias; 29 (82,9%) tinham febre (mediana 2 dias), 27 (77,1%) dor local, 17 (48,6%), sinais inflamatórios da pele e 5 (14,3%) exantema generalizado. Vinte e um (60%) tinham bacteriémia e 7 (20%)

critérios de *sepsis*. Os diagnósticos foram osteomielite (n=13), artrite séptica (n=15), *sepsis* (n=3), pneumonia (n=5), piomiosite (n=2), bacteriemia isolada (n=7). Em nenhum foi documentada endocardite e apenas um apresentava disfunção cardíaca ligeira, com pequeno derrame pericárdico.

<b><i>Quadro III - Características demográficas e clínicas</i></b>			
	Doença invasiva N=35 (%)	IP N=35 (%)	OR
<b>Idade (mediana±dp), anos</b>	4,5±4,8	2,08±5,1	ns*
<b>Idade &lt; 2 anos, n(%)</b>	14(40%)	13(37,1%)	ns
<b>Sexo masculino, n(%)</b>	16(45,7%)	20(57,1%)	ns
<b>Origem africana, n(%)</b>	7(20%)	6(17,1%)	ns
<b>Factores de risco, n(%)</b>	22(62,9%)	25(71,4%)	ns
<b>Febre, n(%)</b>	29(82,9%)	24(68,6%)	ns
<b>Dor intensa, n(%)</b>	27 (77%)	15(42%)	4,55[1,44-14,62]
<b>Sinais inflamatórios, n(%)</b>	17(48%)	35(100%)	0,0[0,0-0,13]

\* ns - não significativo

Nas **infecções de pele e tecido celular subcutâneo** a infecção foi aguda em todos os casos, com um intervalo médio entre o início dos sintomas e o internamento de 3 dias; 24 (68,6%) tinham febre (mediana 2 dias), 35 (100%) sinais inflamatórios da pele e 5 (14,3%) exantema generalizado. Os diagnósticos foram: 17 (48,6%) impétigo/celulite, 16 (45,7%) abscesso e 2 (5,7%) linfadenite. Quanto à localização: face (n=3), pescoço (n=2), tronco (n=2), abdómen (n=2), períneo (n=1) extremidade superior (n=4), extremidade inferior (n=12) e generalizado (n=3).

#### 4.1.2 Avaliação laboratorial

A maioria apresentava aumento da proteína C reactiva (pCr) (44/56; 78,6%) e da velocidade de sedimentação (VS) (14/15; 93%), 17 (24,3%) tinham leucocitose e 1 leucopenia (<5000/mm<sup>3</sup>); 5 (7,1%) tinham alterações da coagulação, 2 (2,9%) alterações nos valores das transaminases e 2 (2,9%) hiponatremia (Quadro IV). No quadro IV estão representadas as alterações laboratoriais presentes nos dois grupos, sendo os parâmetros inflamatórios (pCr) significativamente superiores na população invasiva.

<b>Quadro IV - Características laboratoriais</b>			
	Doença invasiva N=35	Infecção pele N=35	p/OR
<b>Leucócitos (média±dp), /mm<sup>3</sup></b>	10129±8269	12368±6436	ns
<b>Leucocitose (n,%)</b>	10 (28,6%)	7 (20%)	ns
<b>pCr (média±dp), mg/dl</b>	8,5±1,1	1,8±6,3	p=0,007
<b>pCr &gt;1mg/dl (n,%)</b>	28 (80%)	16 (45,7%)	OR 5,25 [1,07-33,5]
<b>VS (média±sd), mm/h</b>	78,5±2,3	-	-
<b>Plaquetas (mean±sd), /mm<sup>3</sup></b>	339000±275735	248000±954400	ns
<b>Trombocitose (n,%)</b>	13 (30%)	4 (11,4%)	OR 3,35 [0,75-19,01]
<b>Alt. coagulação(n,%)</b>	4 (11,4%)	0	-
<b>Alt. transaminases(n,%)</b>	2 (5,7%)	0	-
<b>Hemocultura positiva(n,%)</b>	21(60%)	0	p<0,001

\* ns - não significativo

Nos doentes com infecção invasiva 10 mantiveram culturas positivas, 2 dos quais com hemocultura positiva durante mais de 4 dias (min 5 dias e máx 14 dias), tendo sido efectuado ecocardiograma em 1 caso, que revelou disfunção cardíaca ligeira.



### 4.1.3 Terapêutica antimicrobiana

Em relação à terapêutica antimicrobiana, em dois doentes com IP não se encontrou registo no processo e 4 não fizeram qualquer terapêutica oral, um dos quais com doença invasiva. Os restantes 64 receberam  $\beta$ -lactâmicos como terapêutica inicial (penicilina, aminopenicilina, amoxicilina e ác. Clavulânico, flucloxacilina, cefuroxime ou cefotaxime). O número médio de antibióticos foi de  $2 \pm 1,1$ . O Quadro V mostra os dados em relação à terapêutica antimicrobiana efectuada nas duas populações. A duração do tratamento antimicrobiano variou entre 5 e 60 dias, com uma mediana de 12 dias.

<i>Quadro V – Terapêutica antimicrobiana</i>					
Antimicrobianos (AB)	Doença Invasiva N=35		Infecção pele N=35		p
Nº AB total (mediana $\pm$ dp)	2,0 $\pm$ 1,0		1,5 $\pm$ 1,2		p=0,004
Dias AB ev (mediana $\pm$ dp)	14,0 $\pm$ 11,8		5,0 $\pm$ 4,1		p<0,001
DiasAB <i>per os</i> (mediana $\pm$ dp)	14 $\pm$ 8,3		5,0 $\pm$ 2,3		p<0,001
Antimicrobiano	Inicial	Final	Inicial <sup>#</sup>	Final <sup>#</sup>	
Flucloxacilina, n	23 <sup>*</sup>	25	22 <sup>*</sup>	24	
Outro $\beta$ -lactâmico, n	11	6	8	6	
Clindamicina, n	-	1	6 <sup>**</sup>		
Eritromicina, n	-	1			
Ciprofloxacina, n	-	1			
Vancomicina, n	2 <sup>**</sup>	4 <sup>**</sup>	-	-	
Não fez antimicrobiano, n	1	1	3	3	

Legenda: inicial- terapêutica antimicrobiana instituída na admissão; final –terapêutica antimicrobiana prescrita à data da alta

<sup>#</sup> em 2 doentes com infecção não invasiva não se encontrou registo no processo

<sup>\*</sup> associado à gentamicina em 21 doentes na doença invasiva e em 8 na IP

<sup>\*\*</sup> associado a um  $\beta$ -lactâmico

No **grupo invasivo**, em um doente não foi instituída terapêutica antimicrobiana e 25 foram inicialmente tratados com antibioticoterapia endovenosa anti-estafilocócica (média 1,88 antimicrobianos; variação 1-4) que incluía: vancomicina (associada à cefotaxima) (n=2) ou flucloxacilina (n=23) [associada a um aminoglicosídeo (n=21)] (quadro V). Dois foram medicados com ampicilina (associada à gentamicina) e os

restantes com outro  $\beta$ -lactâmico com actividade contra  $\beta$ -lactamases estafilocócicas [amoxicilina e ac. clavulânico (n=3), cefuroxima (n=3) ou cefotaxima (n=3)]. Efectuaram terapêutica oral subsequente 23, a maioria com flucloxacilina (n=19). A duração mediana da terapêutica oral foi de 14 dias.

Em 3 casos de pneumonia manteve-se a vancomicina pela ausência de melhoria clínica inicial com  $\beta$ -lactâmicos e pela gravidade clínica, apesar das estirpes isoladas serem sensíveis à meticilina. Um lactente com *sepsis* foi medicado com ampicilina e gentamicina, com boa evolução apesar da resistência à penicilina. O doente a quem não foi prescrito antimicrobiano apresentava uma bacteriemia com artrite do joelho, com boa evolução 1 ano após internamento. Os casos de SAMR serão discutidos no ponto 4.4.

No grupo **não invasivo**, em 2 doentes não estava registado no processo e 3 doentes não foram medicados com antimicrobiano, mas apenas submetidos a drenagem cirúrgica. Foram inicialmente tratados com antibioticoterapia endovenosa (média 1,0 antimicrobianos; variação 1-3) com flucloxacilina (n=22), associado a um aminoglicosídeo (n=8) ou à clindamicina (n=6). Dois foram medicados com penicilina (associada à clindamicina) e os restantes com outro  $\beta$ -lactâmico com actividade apesar da presença de  $\beta$ -lactamases estafilocócicas. Nenhum foi medicado com vancomicina. A duração média da antibioticoterapia endovenosa foi significativamente inferior no grupo não invasivo (quadro V). Efectuaram terapêutica oral subsequente 22 doentes, a maioria com flucloxacilina (n=19). A duração mediana da terapêutica oral foi de 5 dias, significativamente inferior à da população invasiva.

Nos dois doentes medicados com penicilina, as estirpes isoladas eram produtoras de  $\beta$ -lactamases, mas foi associada a clindamicina, à qual o microrganismo era sensível.

#### 4.1.4 Evolução clínica

No grupo invasivo a duração média da hospitalização foi de  $15,5 \pm 10,3$  dias e o tempo médio de desfervescência foi de  $4,9 \pm 3,9$  dias; 9 doentes mantinham culturas positivas ao terceiro dia de terapêutica, dois dos quais mantiveram-se com culturas positivas mais de 7 dias; 5 doentes necessitaram de internamento em UCIP e 20 (57,1%) necessitaram de drenagem cirúrgica.

<b>Quadro VI– Evolução</b>			
	<b>Doença invasiva N=35</b>	<b>Infecção pele N=35</b>	p/ OR
Nº dias internamento(mediana $\pm$ dp)	15,5 $\pm$ 10,3	5,0 $\pm$ 4,1	p<0,001
Nº dias desfervescência(mediana $\pm$ dp)	4,9 $\pm$ 3,9	1,0 $\pm$ 1,3	p<0,001
Nº dias cultura positiva(mediana $\pm$ dp)	3,0 $\pm$ 3,4	1,0 $\pm$ 0,8	p=0,002
Nº dias UCIP(mediana $\pm$ dp)	1,2 $\pm$ 3,0	0	ns
Nº cirurgias (mediana $\pm$ dp)	1,5 $\pm$ 0,9	1,0 $\pm$ 0,0	p=0,01
Sequelas/ complicações, n (%)	6 (17,1%)	2 (5,7%)	3,41[0,55-34,5]
Mortalidade, n (%)	1(2,8%)	0 (0%)	ns

No grupo não invasivo a duração do internamento, o tempo de desfervescência e o número de dias de cultura positiva foram significativamente inferiores (quadro VI). Não se identificaram culturas positivas após o início da terapêutica (embora não se tenha registado o número total de culturas pedidas). A mediana do número de intervenções cirúrgicas foi significativamente inferior no grupo não invasivo (quadro VI).

## 4.2 Susceptibilidade aos antimicrobianos

Das 70 estirpes isoladas apenas 11 (15,7%) eram susceptíveis a todos os antibióticos testados. Excluindo a resistência à penicilina (84,3%), 14 (20%) estirpes eram resistentes a outros antimicrobianos (ver Quadro VII).

<i>Quadro VII– Perfil resistência aos antimicrobianos</i>				
<b>Antibiótico</b>	<b>Total N=70 n (%)</b>	<b>Invasiva N=35 n (%)</b>	<b>Não invasiva N=35 n (%)</b>	<b>p/OR</b>
<b>Penicilina</b>	59(84,3)	27(77)	32(91)	ns
<b>Oxacilina</b>	3(4,3)	2(5,7)	1(2,8)	ns
<b>Eritromicina</b>	9(12,9)	4(11,4)	5(14,2)	ns
<b>Fenotipo M</b>	4(5,7)	2(5,7)	2(5,7)	ns
<b>Fenotipo iMLS<sub>B</sub></b>	5(7,1)	2(5,7)	3(8,6)	ns
<b>Clindamicina</b>	5(7,19)	2(5,7)	3(8,6)	ns
<b>Vancomicina</b>	0	0	0	ns
<b>Ciprofloxacina</b>	2(2,9)	1(2,8)	1(2,8)	ns
<b>Gentamicina</b>	1(1,4)	0	1(2,8)	ns
<b>TMP-SMX</b>	0	0	0	ns
<b>Tetraciclina</b>	0	0	0	ns
<b>Rifampicina</b>	1(1,4)	0	1(2,8)	ns
<b>Cloranfenicol</b>	0	0	0	ns

Três (4,3%) eram resistentes à metilina (SAMR), das quais apenas 2 apresentavam concomitantemente resistência a outro antimicrobiano, uma à eritromicina e outra à ciprofloxacina. Nove (12,9%) eram resistentes à eritromicina, das quais 5 com fenótipo iMLS<sub>B</sub> e 4 com fenótipo M. De salientar que duas estirpes resistentes à penicilina eram adicionalmente resistentes a outro grupo de antibióticos (uma à ciprofloxacina e outra à gentamicina). Todas as estirpes eram sensíveis à vancomicina, TMP-SMX e tetraciclina (Quadro VII). Não se verificaram diferenças na susceptibilidade antimicrobiana da população invasiva e não invasiva (Quadro VII e VIII).

<i><b>Quadro VIII- Perfil de resistência aos antimicrobianos testados</b></i>			
<b>Tipo de resistência</b>	<b>Total N=70 n (%)</b>	<b>Invasiva N=35 n (%)</b>	<b>Não invasiva N=35 n (%)</b>
<b>Nenhuma</b>	11 (15,7%)	8(22,8)	3 (8,6)
<b>Um antimicrobiano (Pen)</b>	45 (64%)	21 (60)	24(68,6)
<b>Dois antimicrobianos</b>	8 (11,4%)	4(11,4)	4(11,4)
Pen + FOX	1 (1,4%)	1(2,8)	-
Pen + ER	4 (5,7%)	2(5,7)	2(5,7)
Pen + GN	1 (1,4%)	-	1(2,8)
Pen + cipro	1 (1,4%)	1(2,8)	-
Pen+ Rif	1 (1,4%)	-	1(2,8)
<b>Três antimicrobianos</b>	2 (2,8%)	1(2,8)	1(2,8)
Pen+FOX+Cipro	1(1,4%)	-	1(2,8)
Pen+ER+Clin	4(5,7%)	1(2,8)	3(8,6%)
<b>Quatro antimicrobianos</b>	1 (1,4%)	1(2,8)	-
Pen+FOX+ER+Clin	1 (1,4%)	1(2,8)	-

\*Abreviaturas dos antibióticos: Pen-Penicilina; FOX- Cefoxitina, ER-Eritromicina, Clin-Clindamicina, Cipro-Ciprofloxacina, Rif – Rifampicina, GN- Gentamicina

### **4.3 Características SAMR e comparação SAMS**

Três estirpes eram resistentes à meticilina. Estas estirpes foram detectadas em 2007 (n=2) e 2008 (n=1), respectivamente nos meses de março, julho e agosto, em três doentes internados.

Um dos doentes tinha estado internado na Unidade de Neonatologia após o nascimento e tinha um irmão gêmeo que permanecia internado na Unidade, pelo que a origem associada a cuidados de saúde não se poderá excluir neste caso. Dois não frequentavam o infantário e em um não estava registado no processo. Em nenhum dos casos havia história de lesão da pele, traumatismo prévio ou actividade desportiva prévia.

Dois doentes tiveram infecção invasiva e um infecção não invasiva: um apresentava lesão osteoarticular coxo-femural direita (inicialmente interpretado como paresia do

plexo branquial), que evoluiu com grande extensão local e piomiosite concomitante em diferentes locais. SA foi isolado da única hemocultura pedida ao segundo dia internamento. Foi medicado com vancomicina (desde D5) e gentamicina e submetido a drenagem cirúrgica (em D5). Ficou apirético ao 9º dia de internamento com boa evolução.

O segundo foi um lactente com abscesso do psoas, medicado com cefuroxima e gentamicina que evoluiu bem após drenagem cirúrgica, apesar de a terapêutica antimicrobiana instituída ser questionável.

O terceiro foi um recém-nascido com linfadenite e abscesso na região inguinal, submetido a drenagem cirúrgica com boa evolução apesar de antibioticoterapia pouco adequada (flucloxacilina e gentamicina).

Não se verificaram diferenças entre as características demográficas nas duas populações. Realçamos contudo uma tendência para o maior número de recém-nascidos nas infeções por SAMR(Quadro IX).

<i><b>Quadro IX – Aspectos demográficos de doentes com SAMR/SAMS</b></i>			
	<b>SAMR*</b> <b>N=3</b>	<b>SAMS</b> <b>N=67</b>	<b>P</b>
<b>Idade (mediana±dp)</b>	0,08±3,4	3,2±4,9	ns
<b>Idade &lt; 2 anos, n(%)</b>	2(66,7%)	25 (37,3%)	ns
<b>Sexo masculino, n(%)</b>	1 (33,3%)	35(52,2%)	ns
<b>Origem africana, n(%)</b>	0	13(19,4%)	ns
<b>Ferida cutânea, n(%)</b>	0	20(29,9%)	ns
<b>Trauma, n(%)</b>	0	5 (7,5%)	ns
<b>RN, n(%)</b>	2 (66,7%)	8(11,9%)	<b>0,05</b>
<b>Adolescentes, n(%)</b>	0	9(13,4%)	ns

Não se encontraram diferenças significativas entre as características clínicas e laboratoriais entre SAMS e SAMR, com excepção da piomiosite que foi significativamente superior no grupo SAMR (Quadro X).

<i>Quadro X – Características clínicas e laboratoriais em isolados SAMR/SAMS</i>			
	<b>SAMR N=3</b>	<b>SAMS N=67</b>	<b>P</b>
Infecção invasiva, n(%)	2 (66,7%)	33(49,2%)	ns**
Infecção Osteoarticular, n(%)	1(33,3%)	20(29,8%)	ns
Pneumonia, n(%)	0	5 (7,5%)	ns
Piomiosite, n(%)	2(66,7%)	0	<b>0,001</b>
Infecção da Pele, n(%)	1 (33,3%)	34 (50,7%)	ns
Febre, n(%)	1 (33,3%)	51 (76,1%)	ns
Defervescência(mediana± dp)/dia	9	2,0±3,2	ns
Leucocitos(mediana± dp)/mm3	16050±1680	12228±7663	ns
Leucocitose, n(%)	2(66,7%)	15(22,4%)	ns
Trombocitose, n(%)	2(66,7%)	15(22,4%)	ns
pCr (mediana± dp), mg/dl	13,7±19,3	5,6±9,3	ns
pCr >1mg/dl , n(%)	1 (33,3%)	43 (64,2%)	ns
VS (mediana± dp), mm/h	82*	75±24,5	ns
Hemocultura positiva, n(%)	2 (66,7%)	19 (28,4%)	ns
LPV, n(%)	0	16 (23,9)	ns

\* análise efectuada em apenas 1 doente; \*\* ns- não significativo

As intervenções cirúrgicas foram feitas numa elevada percentagem de casos nos dois grupos. A duração da terapêutica e da hospitalização foi semelhante, assim como o número de dias de cultura positiva (Quadro XI).

Comparando os perfis de resistência em relação aos outros antimicrobianos entre as estirpes SAMR e SAMS, não se verificaram diferenças significativas (Quadro XII).

<b>Quadro XI – Evolução doentes SAMR/SAMS</b>			
	<b>SAMR N=3</b>	<b>SAMS N=67</b>	<b>p</b>
Dias Cultura positiva (mediana± dp), dias	0±0,0	1,0±2,2	ns
Nº antibióticos (mediana± dp), dias	2,0±1,5	2,0±1,1	ns
Terapêutica inicial β-lactâmico, n(%)*	3 (100%)	61(91%)**	ns
Terapêutica final vancomicina, n(%)	1 (33,3%)	2 (3,0%)	ns
Duração antibioterapia (mediana±dp), dias	10±12,1	12±14,5	ns
Nº intervenções cirúrgicas, n(%)	1,0±0,0	1,0±0,8	ns
Duração internamento, n(%)	10±4,1	9,0±9,8	ns
Complicações, n(%)	1(33,3%)	8(11,9%)	ns
Sequelas, n(%)	0	8(11,9%)	ns

\* associado à gentamicina nos três casos; \*\* 4 com cefotaxima e vancomicina; \* ns- não significativo

<b>Quadro XII – Comparação perfil resistência MRSA e MSSA</b>			
<b>Antibiótico</b>	<b>Total N=70 N(%)</b>	<b>SAMS N=67 N(%)</b>	<b>SAMR N=3 N(%)</b>
Eritromicina	9(12,9)	8(12)	1(33)
Fenotipo M	4(5,7)	4(6)	0
Fenotipo iMLS <sub>B</sub>	5(7,1)	4(6)	1(33)
Vancomicina	0	0	0
Ciprofloxacina	2(2,9)	1(1,5)	1(33)
Gentamicina	1(1,4)	1(1,5)	0
TMP-SMX	0	0	0
Tetraciclina	0	0	0
Rifampicina	1(1,4)	1(1,5)	0
Cloranfenicol	0	0	0



De entre as estirpes SAMR uma era isoladamente resistente à oxacilina, outra estava associada à resistência à eritromicina (padrão iMLS<sub>B</sub>) e outra associada à resistência à ciprofloxacina. Nas três estirpes resistentes à meticilina, todas eram positivas para o gene *mecA*. Não foram obtidas as CIM para a oxacilina e vancomicina nestes casos. Nenhuma era portadora do gene LPV.

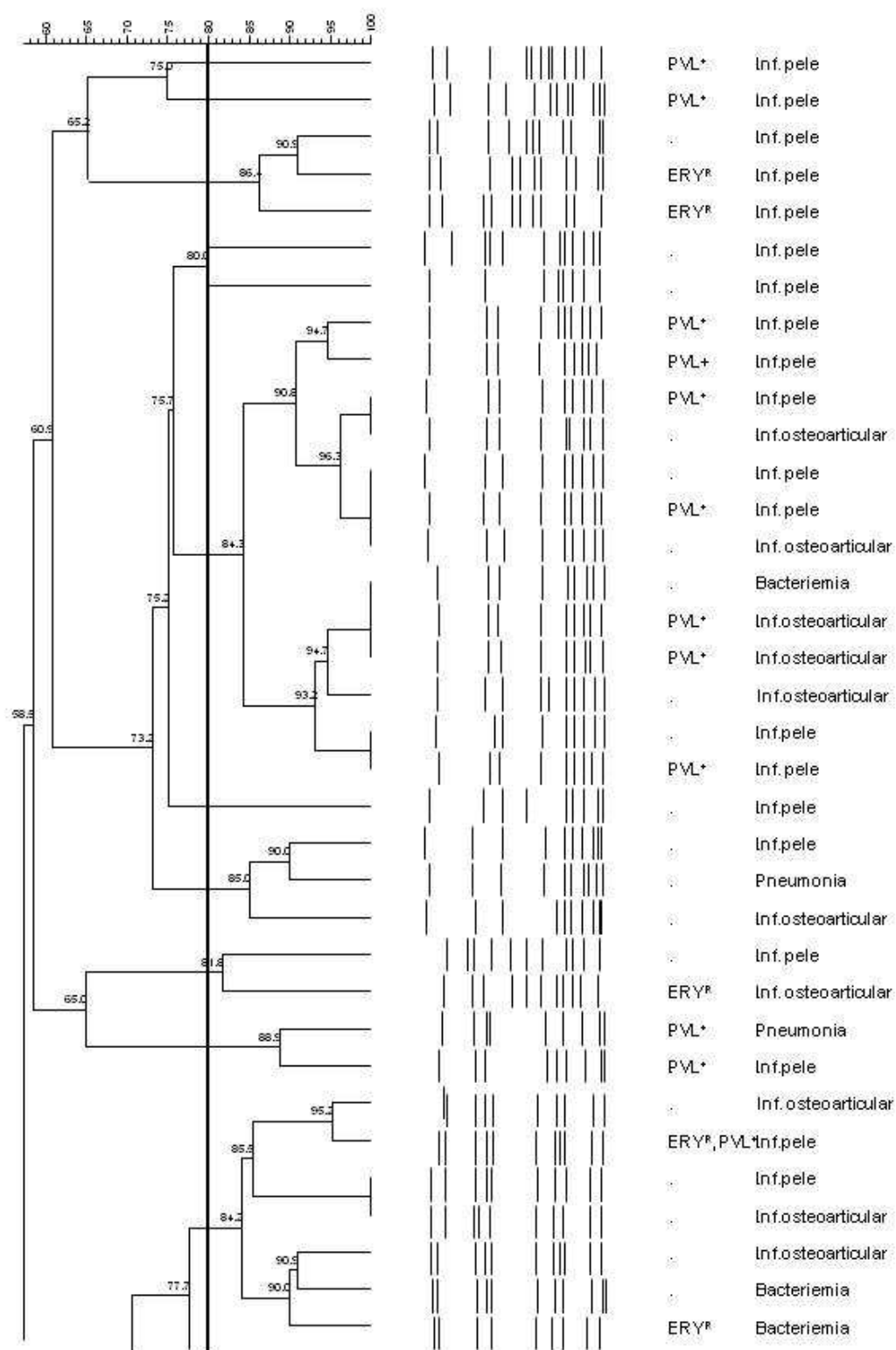
#### **4.4 Análise clonal (PFGE e *spa* type)**

A análise dos perfis gerados por PFGE revelou que há 15 clones distintos responsáveis por infecção invasiva e não invasiva. O número de estirpes presente em cada um dos clones variou consideravelmente (entre 13 a 2) (Figuras 2 e 3). Apesar da variabilidade genética 34 (48,9%) pertenciam a 5 tipos clonais *major*. Dez estirpes (14,3%) apresentavam perfis únicos.

O maior clone identificado por PFGE foi o tipo C, sendo composto por 13 estirpes responsáveis por IP (n=7) e doença invasiva (n=6), 7 das quais LPV positivas (5 de IP e 2 infecção Osteoarticular).

No grupo de doença invasiva identificaram-se 13 clones, número igual ao encontrado no grupo não invasivo. A maioria dos clones incluía estirpes invasivas e não invasivas (coeficiente Wallace =0,4898). No entanto, alguns clones estavam mais representados num tipo de infecção, por exemplo clone A e B apenas implicados em infecção não invasiva e clone H, M e N em doença invasiva (diferença não significativa).

As 9 estirpes resistentes à eritromicina estavam distribuídas por 7 clones diferentes.





As estirpes meticilino-resistentes não pertencem ao mesmo clone, por PFGE e *spa type*: uma está incluída no clone PFGE tipo H, *spa* t008 (em conjunto com duas estirpes de SAMS responsáveis por doença invasiva (uma pneumonia e uma bacteriemia); as outras duas têm perfis únicos por PFGE e tipos *spa* diferentes (*spa* t062 e *spa* t022). Contudo estas estirpes têm, por PFGE, uma percentagem de similaridade de 77%, segundo o coeficiente Dice, com outras estirpes SAMS pertencentes respectivamente aos clones de PFGE tipo G e O.

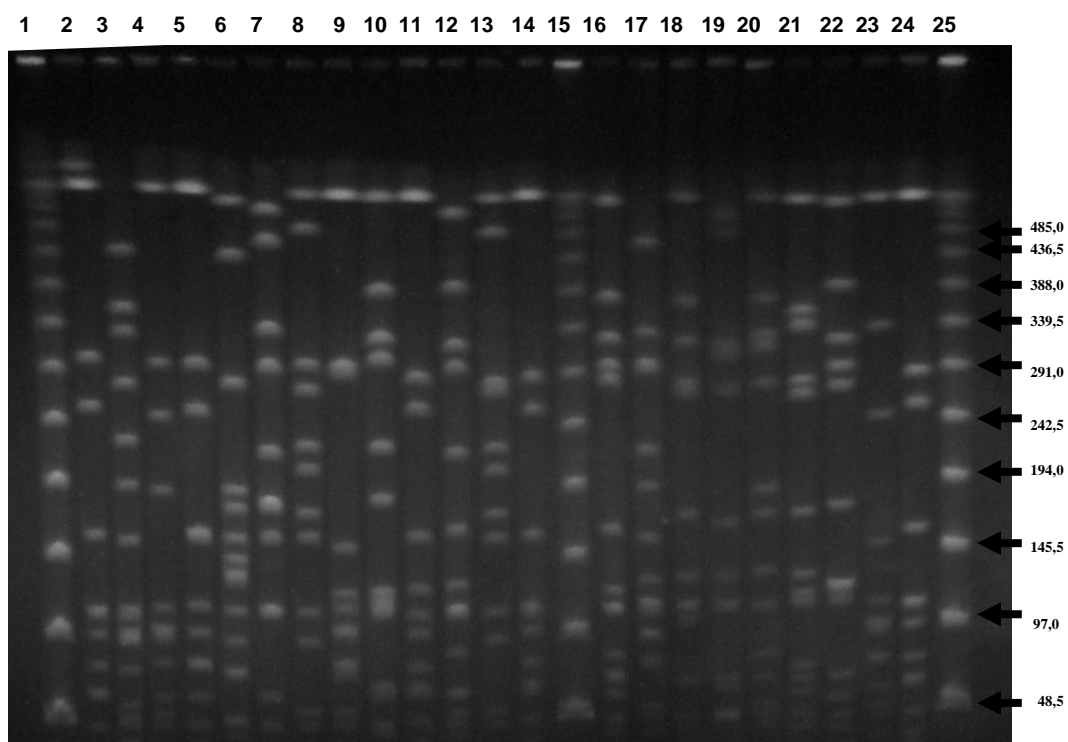


FIG. 3– Perfis gerados por PFGE após digestão com SmaI. Linhas 1, 15 e 25 *lambda ladder PFGE marker*. Linhas 2 a 14 e 16 a 24 estirpes de SA em estudo. Os números à direita indicam o peso molecular (em Kilobases)

#### 4.5 Leucocidina de Pantón Valentine

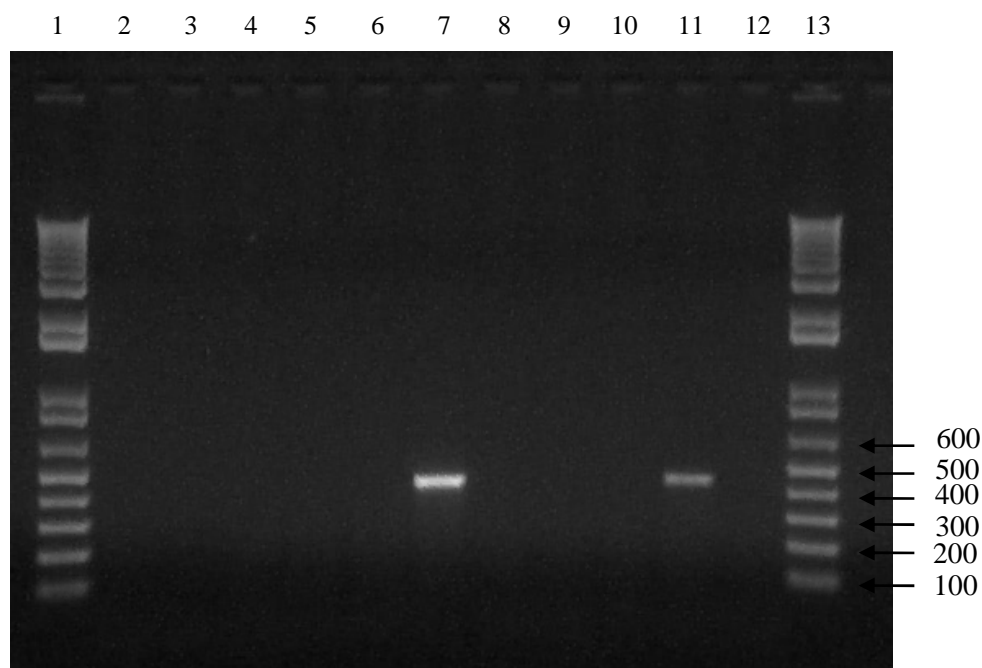


FIG.4 PCR para detecção do gene LPV. Linhas 1 e 13 marcador de tamanho molecular *1Kb plus*. Os números à direita indicam o peso molecular (em Kilobases)

O gene que codifica para a LPV estava presente em 16 estirpes (22,9%), sendo menos frequente na infecção invasiva [3 (8,6%) *versus* 13 (37%); OR-0,16 [0,03-0,69]] e nos doentes com bacteriémia (Quadro XIII). Dez (62,5%) estirpes isoladas de abscessos e 4 (21,4%) de celulites tinham o gene LPV, em contraste com as linfadenites (0%). Apenas 1 (20%) estirpe isolada de pneumonia e 2 (9,5%) de infecções osteo-articulares eram positivas para a LPV (Quadro XIII). Nenhuma estirpe era concomitantemente metilino-resistente.

<i>Quadro XIII – Características clínicas em isolados LPV+ e LPV-</i>			
	<b>LPV+</b> <b>N=16</b> <b>n (%)</b>	<b>LPV-</b> <b>N=54</b> <b>n (%)</b>	<b>p</b>
Invasiva	3 (8,5%)	32 (59,3%)	p=0,009
Osteoarticular	2 (12,5%)	20 (37%)	p=0,056
Pneumonia	1 (6,2%)	4 (7,4%)	ns*
Bacteriemia/ <i>sepsis</i>	0(0%)	21 (38,9%)	p=0,002
Abscesso muscular	0 (0%)	1 (1,8%)	ns
Não invasiva	13 (81,2%)	27(50%)	p=0,009
Abscessos	10 (62,5%)	6 (11,1%)	p<0,001
Celulites/ impetigo	3 (18,8%)	14 (25,9%)	ns
Linfadenite	0	2 (3,7%)	ns

\* ns- não significativo

Os quadros XIV e XV mostram as características demográficas, clínica e evolução das crianças infectadas por estirpes LPV positivas e negativas. A história de traumatismo foi mais frequente nos doentes com estirpes LPV positivas (Quadro XIV)

<i>Quadro XIV – Características demográficas dos doentes com estirpesLPV+ e LPV-</i>			
	<b>LPV+</b> <b>N=16</b>	<b>LPV-</b> <b>N=54</b>	<b>p</b>
Idade (mediana± sd), anos	4,05±4,866	2,6±4,99	ns*
Sexo masculino, n° (%)	8(50%)	28 (51,9%)	ns
Origem africana, n°(%)	1 (6,2%)	12 (22,2%)	ns
Ferida cutânea, n°(%)	5 (31,2%)	15 (27,8%)	ns
Traumatismo, n° (%)	4 (25%)	1 (1,9%)	<b>0,008</b>
Adolescente, n°(%)	1 (6,2%)	8 (14,8%)	ns
Recém-nascido, n°(%)	2 (12,5%)	10 (18,5%)	ns

\* ns- não significativo

Não se verificaram diferenças entre as características clínicas e laboratoriais das duas populações, com excepção do número de hemoculturas positivas, mais frequentes na população LPV negativa (Quadro XV).

<i><b>Quadro XV – Características clínicas e laboratoriais dos doentes com estirpes LPV+ e LPV-</b></i>			
	<b>LPV+</b> <b>N=16</b>	<b>LPV-</b> <b>N=54</b>	<b>p</b>
Febre, n(%)	10 (62,5%)	42 (77,8%)	ns
Defervescência (mediana± dp), dias	1,0±2,6	2,0±3,5	ns
Leucocitos(mediana± dp)/mm <sup>3</sup>	12329±8007	12024±7424	ns
Leucocitose, n(%)	3 (18,8%)	14 (25,9%)	ns
PCR (mediana± dp), mg/dl	3,2±11,6	6,2±9,2	ns
PCR >1mg/dl, n(%)	10 (100%)	34 (73,9%)	ns
VS (mediana± dp), mm/h	82±9,89	75±2,5	ns
Hemocultura positiva, n (%)	0	21 (38,9%)	<b>0,001</b>
Cultura positiva (mediana± dp), dias	0,0±3,7	0,0±1,5	ns
Duração internamento	9,0±7,4	9,5±9,9	ns
Sequelas	2 (12,5%)*	7 (12,9%)	ns
Nº antibióticos	2,0±0,9	2,0±1,22	ns
Nº cirurgias	1,0±2,0	1,0±0,87	ns

\* infecções cutâneas recorrentes posteriores

#### **4.5.1 População com infecção não invasiva**

Analisando apenas a população com infecção não invasiva, não se verificaram diferenças significativas entre a população LPV positiva e negativa em relação às características demográficas e clínicas e de evolução, com excepção da PCR, que foi significativamente superior (mediana 3,2 vs 0,56; p=0,03) na população LPV positiva.

#### 4.5.2 População com infecção invasiva

Analisando apenas a população com infecção invasiva não se verificaram diferenças significativas entre a população LPV positiva e negativa em relação às características demográficas e clínicas, com excepção da hemocultura positiva (tendência para ser mais frequente LPV negativos) (Quadro XVI e XVII).

<i><b>Quadro XVI- Alts clínicas em doentes com infecção invasiva por estirpes LPV+/LPV-*</b></i>		
	<b>LPV+</b> <b>N=3</b>	<b>LPV-</b> <b>N=32</b>
Idade média (mediana $\pm$ dp), anos	4,1 $\pm$ 3,2	5,2 $\pm$ 4,9
Idade < 2 anos, n (%)	11 (33,3%)	13 (40,6%)
Sexo masculino, n(%)	1 (33,3%)	15 (46,9%)
Recém-nascidos, n(%)	0	7 (21,9%)
Adolescente, n (%)	0	5 (15,6%)
Origem africana, n(%)	0	7 (21,9%)
Traumatismo, n(%)	1 (33,3%)	0 (100%)
Ferida cutânea, n(%)	0	8 (25%)
Infecção viral prévia, n(%)	0	7 (21,9%)

\* a análise estatística não revelou diferenças não significativas

Analisando a relação entre a presença do gene LPV e a diversidade clonal verificou-se que as estirpes LPV positivas estavam distribuídas por 10 clones (7 estirpes clone C; 2 clone F; 2 no clone I; 1 clone G; 1 no L, 1 no P e 2 com perfil único) (coeficiente Wallace PFGE $\rightarrow$ LPV)=0.6054



<b>Quadro XVII- Alts clínicas e laboratoriais em infecção invasiva lpv+/lpv-</b>			
	<b>LPV+</b> <b>N=3</b>	<b>LPV-</b> <b>N=32</b>	<b>p</b>
Duração sintomas antes diagnóstico	2,0±0,577	3,0±2,3	ns*
Febre, n(%)	1 (33,3%)	27 (84,5%)	ns
Ar séptico, n(%)	1(33,3%)	16 (50%)	ns
Nº dias UCIP, (mediana±dp)	0,0±1,2	0,0±3,4	ns
VS (mediana±dp)/mm3	82±9,9	78±2,5	ns
PCR (mediana±dp)/mg/dl	17,5±23,8	8,47±10,0	ns
Leucocitos (mediana±dp)/mm3	7175±1661	11820±8402	ns
Hemocultura positiva, n(%)	0	21 (65,6%)	<b>0,05</b>
Nº intervenções cirúrgica(mediana±dp)	1,0±0,58	1,0±1,0	ns
Cultura positiva (mediana±dp), dias	0,0±8,08	0,0±1,86	ns
Nº antibióticos(mediana±dp)	1,0±1,7	2,0±1,0	ns
Sequelas, n(%)	1	6	ns
Duração internamento (mediana±dp),dias	9,0±15,5	15,5 ± 10,2	<b>0,034</b>

\* ns- não significativo

## 4.6 Situações clínicas específicas

### 4.6.1 Infecções músculo-esqueléticas

Das 35 crianças com doença invasiva 21 tinham infecções osteo-articulares e 1 abscesso muscular; 12(54,5%) eram do sexo masculino, 3 (13,6%) de raça negra e a idade mediana foi de 7,0 ± 5,1 anos; 8 (36,4%) tinham menos de 2 anos, 5 (22,7%) eram recém-nascidos e 4 (18,2%) adolescentes; 1 (4,5%) referia história de traumatismo, 5 (22,7%) feridas cutâneas.

Todos tinham dor e impotência funcional; 16 (72,7%) febre, 9 (40,9%) ar séptico à entrada, 12 (54,5%) sinais inflamatórios. Nenhum apresentava exantema generalizado.

Das 15 artrites sépticas a localização foi: 10 na anca, 2 no joelho e 2 multifocal. Sete tinham osteomielite concomitante (2 multifocais, 2 no joelho e 3 na anca). Seis tinham osteomielite isolada, 1 multifocal (úmero e tibia), 3 membro inferior (2 femur, 1 tibia) e 2 membro superior (1 úmero e 1 rádio). Outro manifestava uma bursite do cotovelo. Um tinha um abscesso do psoas ilíaco; A mediana da PCR foi de  $8,3 \pm 1,1$  mg/dl e dos leucócitos de  $12350 \pm 9345/\text{mm}^3$ .

SA foi isolado de aspirado ósseo/sinovial em 14 e por hemocultura em 12; 7 tinham mais que dois isolamentos; 6 mantiveram culturas positivas mais 48 horas (em 2 mais de 4 dias) após o início da terapêutica antimicrobiana. Em 6 observaram-se complicações músculoesqueléticas: abscesso ósseo/subperiósteo(4), piomiosite (1), extensão local (3); O número médio de dias de hemoculturas positivas após antibioterapia foi de 1,45 dias.

Foram identificadas alterações ósseas por radiografia em 3 casos; a maioria (95%) fez ecografia que mostrou derrame articular em 9 e abscesso em 5; 10 (50%) realizaram cintigrafia, que revelou hipersinal em todas; A ressonância magnética efectuada em 5 doentes, mostrou sinais de extensão local (2), abscessos profundos (1), piomiosite (1).

Dezassete foram submetidos a intervenção cirúrgica; A maioria (18) foi tratada inicialmente com flucloxacilina e gentamicina; A duração mediana da antibioterapia endovenosa foi de 21 dias, mínimo de 5 dias e máximo de 60 dias; a duração mediana da terapêutica oral posterior foi de 14 dias, variando entre 0 dias e 38 dias; Em 1 a antibioterapia foi alterada para vancomicina pela má evolução clínica, apesar de susceptível à oxacilina. Em dois casos foi iniciada a vancomicina por SAMR, que não se confirmou num destes casos. Quatro ficaram com sequelas, nomeadamente

discrepância de tamanho (1), alterações ósseas na radiografia (2) e impotência funcional(2).

Dois doentes eram metililino-resistentes. Um tinha uma osteomielite extensa, complicada com artrite séptica, miosite e sepsis e outro piomiosite do músculo psoas ilíaco (ver capítulo SAMR-AC).

Dois doentes eram LPV positivos. Um tinha uma bursite pós-traumática do cotovelo esquerdo, sem bacteriemia. Foi medicado com flucloxacilina e submetido a drenagem cirúrgica ao 1º dia internamento com boa evolução. O outro tinha uma osteomielite aguda do rádio, com hemocultura negativa. Medicado com flucloxacilina e intervenção cirúrgica no 1º dia internamento, com boa evolução. A comparação dos doentes com LPV negativa e positiva estão representados nos quadros XVIII, XIX e XX.

<b><i>Quadro XVIII – Aspectos demográficos de doentes com Infecção musculo esquelética</i></b>			
	<b><i>LPV+/-</i></b>		
	<b>LPV+</b>	<b>LVP-</b>	<b>p</b>
	<b>N=2*</b>	<b>N=20</b>	
Idade (mediana±dp), anos	4,45±4,6	7,0±5,2	0,86
Sexo masculino, n(%)	1 (50%)	11(55%)	1,0
Origem africana, n(%)	-	3(15%)	-
Ferida cutânea, n(%)	0	5(25%)	1,0
Trauma, n(%)	1	0	-
Recém-nascido, n(%)	0	5(25%)	-
Adolescentes, n(%)	0	4(20%)	-

\* 1 bursite do cotovelo e 1 artrite séptica

Não se encontraram diferenças nos dois grupos, com excepção do número de antimicrobianos, significativamente superior no grupo LPV negativo. A diferença entre

a duração do internamento é importante, embora não tenha sido significativa (Quadro XX).

<b><i>Quadro XIX – Características clínicas e laboratoriais em isolados LPV+ e LPV- de inf. músculo esqueléticas</i></b>			
	<b>LPV+</b> <b>N=2</b>	<b>LVP-</b> <b>N=20</b>	<b>p</b>
Febre, n(%)	0	15 (75%)	0,09
Defervescência(mediana± dp)/dia	0,0	4,0±4,4	-
Leucocitos(mediana± dp)/mm <sup>3</sup>	8350**	12375±9501	-
Leucocitose, n(%)	0	7 (35%)	-
PCR (mediana± dp), mg/dl	1,13**	8,47±10,9	-
PCR >1mg/dl , n(%)	1**	18 (90)	-
VS (mediana± dp), mm/h	75**	78,5±24,9	-
Hemocultura positiva, n(%)	0	12 (60%)	

\*\* só 1 fez análises

<b><i>Quadro XX – Evolução doentes com Infecção músculo esquelética LPV+/-</i></b>			
	<b>LPV+</b> <b>N=2*</b>	<b>LPV-</b> <b>N=20</b>	<b>p</b>
Dias Cultura positiva (media± sd)	0,0±0,0	1,45±2,2	0,45
Nº antibióticos,(mediana±dp)	1,0±1,0	2,0±0,9	<b>0,038</b>
Duração antibioterapia, (mediana±sd)	15,5±7,8	30±15,4	0,08
Nº cirurgias,(mediana±dp)	1,0±0,0	1,0±1,0	0,5
Duração internamento, (mediana±dp), dias	5,0±5,7	20,0±10,3	0,078
Complicações, n(%)	0	6(30%)	0,5
Sequelas, n(%)	0(0%)	4(20%)	0,66

#### 4.6.2. Infecção Pulmonar complicada

Das 35 crianças com doença invasiva 5 tinham pneumonia complicada, 3 eram transferidos de outro hospital; 1 (20%) sexo masculino e 5 (100%) caucasianos. A idade mediana foi de  $4,5 \pm 4,5$  anos, um (20%) tinha menos de 2 anos e outro (20%) era adolescente. Três tinham factores de risco associados, nomeadamente 1 (20%) infecção de pele por SAMS no mês anterior medicada em ambulatório; e dois um quadro de rinfaringite viral a preceder o quadro, apesar de não ter sido documentada co-infecção com *influenza* (Maio e Junho 2006); todos tinham febre, ar séptico e respiração superficial, traduzindo dor. Dois tinham polipneia, com hipoxemia. Não havia referência a hemoptises. Nenhum tinha diarreia ou exantema.

Todos realizaram múltiplas radiografias torácicas e três tomografia axial computadorizada. Todos tinham derrame pleural; encontraram-se ainda densidades pulmonares bilaterais (1), pneumatocelos (1), piopneumotorax volumoso (1) e abscessos pulmonares (2).

A mediana da PCR foi de  $18,9 \pm 8,3$  mg/dl, leucócitos  $6700 \pm 5142/\text{mm}^3$ . SA foi isolado do líquido pleural em todos os casos, 2 com hemocultura também positiva.

O número médio de antimicrobianos efectuados foi de 3,5 (mínimo 2; máximo 4). O tempo médio de antibioticoterapia endovenosa foi de 18,25 dia (min 7 e max 31 dias). Quatro foram medicados com cefotaxime e vancomicina após ausência de melhoria da terapêutica inicial com  $\beta$ -lactâmicos (amoxicilina e ácido clavulânico ou penicilina). Uma foi medicada com cefuroxime e gentamicina com boa evolução. Três necessitaram de suporte ventilatório; Todos foram submetidos a drenagem torácica e 3 desbridamento. Quatro mantiveram febre pelo menos 7 dias após o início da terapêutica e 1 faleceu.

Todas as estirpes eram SAMS. Foi identificada uma estirpe LPV positiva numa criança de etnia cigana, com pneumonia cavitada, com abscesso e extenso hidropiopneumotorax, medicada com cefotaxime e vancomicina e submetida a desbridamento e drenagem cirúrgica ao D4 e D9 de doença, com boa evolução após 1 ano. Manteve culturas do derrame pleural positivas até 14 dias após o início da antibioterapia.

<b><i>Quadro XXI – Aspectos demográficos dos doentes com Pneumonia LPV+/-</i></b>		
	<b>LPV+</b> <b>N=1</b>	<b>LVP-</b> <b>N=4</b>
Idade (mediana±dp), anos	4,1	5,3±5,0
Sexo feminino, n(%)	1	1(25%)
Origem africana, n(%)	1	4
Idade < 2 anos, n(%)	0	1 (25%)
Infecção viral prévia, n(%)	0	2 (50%)
Adolescentes, n(%)	0	1(25%)

Não se verificaram diferenças significativas em relação aos parâmetros demográficos, clínica, laboratoriais e de gravidade em relação às outras pneumonias LPV negativas, dado o número pequeno de casos (Quadros XXI, XXII, XXIII).

<b><i>Quadro XXII – Características clínicas e laboratoriais em isolados de Pneumonias, LPV+ e LPV-</i></b>		
	<b>LPV+</b> <b>N=1</b>	<b>LVP-</b> <b>N=4</b>
Febre, n(%)	1 (100%)	4 (100%)
Hemoptises, n(%)	0	0
Sepsis, n(%)	1(100%)	4(100%)
Defervescência(mediana± sd)/dia	8,0	5,0±2,8
Leucocitos(mediana± sd)/mm <sup>3</sup>	6000	7400±5943
PCR (mediana± sd), mg/dl	34,0	18,3±2,1
VS (mediana± sd), mm/h	89	-
Hemocultura positiva, n(%)	0	1 (25%)
Derrame pleural	1	4
Infiltrado unilateral	1	3

<b><i>Quadro XXIII – Evolução doentes com Pneumonia LPV+/-</i></b>		
	<b>LPV+ N=1</b>	<b>LPV- N=4</b>
Dias Cultura positiva (mediana± dp)	14,0	1,0±1,2
Nº antibióticos, n(%)	4,0	3,0±1
Duração antibioterapia (mediana±dp)	35	21±11
Nº cirurgias, n(%)	1	1±2
Duração internamento(mediana±dp), dias	31	19±12
Complicações, n(%)	1	2(50%)
Sequelas, n(%)	1(100%)	2(50%)





## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 *Características clínicas e epidemiológicas*

A incidência das infecções por SA-AC é desconhecida(91). Vários estudos têm evidenciado um aumento da incidência de infecções por SA nos últimos anos, contudo alguns factores limitam as conclusões, nomeadamente o desconhecimento da proporção de infecções em que é efectuado o exame microbiológico e o estudo preferencial das estirpes SAMR(67, 91). De facto, Bernard *et al*, num estudo prospectivo em doentes com IP com origem na comunidade, verificou que apenas 42% das infecções eram confirmadas laboratorialmente(10).

As causas para este aumento da incidência são pouco claras. Uma das hipóteses propostas foi de que a implementação da vacina pneumocócica 7 valente terá contribuído para o aumento da colonização nasal por SA, uma vez que os serotipos vacinais parecem competir com SA para a colonização(12). No entanto, outros estudos não o parecem sugerir(67, 74).

Nos EUA, entre 2001 e 2003, registaram-se 11,6 milhões de consultas anuais por IP, a maioria presumivelmente por SA (86). No mesmo país, as urgências por IP aumentaram significativamente de 1995 a 2004 atingindo os 3,4 milhões(104). Também a infecção invasiva parece estar a aumentar, nomeadamente a osteomielite por SAMS(87).

No estudo realizado identificaram-se 132 crianças e adolescentes internadas por IP, o que corresponde a 0,4% dos internamentos. Detectaram-se 35 casos de doença invasiva (0,1% dos internamentos), números que são significativos.

Existem poucos estudos que descrevam a epidemiologia actual das infecções por estirpes SAMS-AC, sendo a maioria referentes a SAMR, que surgem com maior frequência em populações seleccionadas, relativamente homogéneas(91). Em 1976, Shulman *et al* descreveu a ocorrência rara de *sepsis* a SA em 9 adolescentes sem factores de risco conhecidos(124). Esta questão foi esquecida até recentemente, altura em começaram a ser descritas infecções graves por SA associados à resistência à meticilina na ausência de factores de risco.

Classicamente, as infecções a SA associam-se à idade inferior a 2 anos, grupos etários pediátricos extremos (recém-nascidos e adolescentes), más condições de higiene, história prévia de síndrome gripal, feridas cutâneas, traumatismos ou infecções recorrentes por SA(99). As características retrospectivas deste estudo limitam as conclusões, uma vez que muitos dados, como as condições socioculturais não estavam registados no processo clínico. Salienta-se contudo, o elevado número de crianças com menos de 2 anos (37%), dos quais 10 (14%) recém-nascidos, e 9(13%) adolescentes.

Nos recém-nascidos as manifestações clínicas são em geral insidiosas e inespecíficas, o que atrasa o diagnóstico e compromete o prognóstico(47, 61). De facto, em dois recém-nascidos o diagnóstico foi protelado em ambulatório, tendo-se confundido um quadro de pseudo paralisia por dor com uma lesão do plexo braquial.

Também o eczema predispõe para a colonização e posterior infecção por SA, em concordância com o número de doentes internados com este diagnóstico (4).

Na população adulta e pediátrica 85 a 95% das infecções por SA são IP (91). Igualmente no nosso estudo 79% dos SA isolados das crianças internadas correspondiam a IP, dos quais apenas 35 estirpes foram estudadas. Os diagnósticos mais

frequentes em doentes internados por IP são abscessos e celulites, de gravidade muito variável, tal como observado no estudo realizado(61).

As infecções invasivas incluem as musculoesqueléticas, *sépsis*, bacteriemia, pneumonias complicadas, entre outras. A maioria das vezes o quadro cursa com bacteriemia, febre e sinais inflamatórios locais, tal como observado. Neste estudo a maioria dos doentes com doença invasiva o foco era músculo-esquelético(91).

Apesar de controverso alguns autores recomendam a realização de um ecocardiograma nos doentes com bacteriemia por SA(41). Num estudo realizado na África do Sul 4/36 doentes sem sintomas de endocardite apresentavam alterações ecocardiográficas significativas(43). Parece pois prudente realizar um ecocardiograma nos doentes em que, apesar da terapêutica antimicrobiana adequada, mantêm hemocultura positiva por mais de 4 dias(41). No nosso estudo dos 2 doentes com bacteriemia há mais de 4 dias apenas 1 realizou ecocardiograma, que mostrou disfunção cardíaca ligeira, sem endocardite.

Nas IP, sobretudo nas lesões purulentas, a terapêutica de primeira linha é a incisão e drenagem, associada ou não a antibioticoterapia (66, 72, 95). De facto, um estudo prospectivo realizado em crianças saudáveis com abscessos da pele/tecido celular subcutâneo concluiu que a incisão ou drenagem de abscessos com um diâmetro inferior a 5 cm, mesmo sem terapêutica antimicrobiana, era adequado(76). No nosso estudo três doentes com IP não realizaram terapêutica antimicrobiana, mas apenas drenagem cirúrgica, com boa evolução, o que poderá estar relacionado com estes factores.

Nas IP de maiores dimensões ou progressivas, associadas a sinais inflamatórios importantes, e em grupos etários extremos, como nos lactentes, a terapêutica

antimicrobiana é fundamental(50). Em Portugal, uma vez que a prevalência de SAMR-CA é baixa, como foi determinado neste estudo, uma infecção por SA-AC deve ser tratada como susceptível à meticilina. A terapêutica definitiva deve ser baseada nos resultados do antibiograma (dado fundamental), uma vez que a resposta clínica das infecções por SA é previsível pela susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos.

Assim, o tratamento antimicrobiano recomendado para as IP não complicadas é a flucloxacilina 5 a 7 dias ou em alternativa a amoxicilina e ácido clavulânico(72). Alguns autores apontam para os baixos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos da flucloxacilina administrada por via oral, pelo que não a recomendam(95). Neste estudo contudo, a maioria fez flucloxacilina endovenosa, seguida de oral (62,9%) com boa evolução. Dois doentes tratados com penicilina eram produtores de  $\beta$ -lactamases, mas estavam adicionalmente medicados com clindamicina, à qual a estirpe era sensível. Nas IP mais graves, como nas celulites extensas ou fasciitis necrotizantes, a associação da clindamicina, com actividade anti-toxina, poderá ser recomendada(95), razão pela qual foi utilizada em vários doentes do nosso estudo com IP mais extensas. Porém poderemos reflectir sobre a vantagem da sua utilização, uma vez que antimicrobianos com actividade contra estirpes resistentes à meticilina devem ser poupados para infecções invasivas graves, como a *sepsis*(72)

Nos doentes com infecção invasiva é fundamental a antibioticoterapia sistémica de acordo com as resistências locais. Apesar disso, um doente com artrite séptica e bacteriemia não fez qualquer antimicrobiana, com regressão total da sintomatologia, o que é raro, mas não inédito e dependerá seguramente da resposta do hospedeiro.

A duração do regime antimicrobiano preconizado varia com o tipo e gravidade da infecção(61). No nosso estudo, a duração da terapêutica e da hospitalização foi significativamente superior no grupo invasivo, traduzindo estas diferenças.

A terapêutica com flucloxacilina associada a um aminoglicosídeo ou à clindamicina continua uma boa opção, correspondendo à terapêutica adoptada na maioria dos doentes neste estudo.

As quinolonas pelo facto de serem tóxicas para as cartilagens articulares de animais em crescimento estão, por princípio, contraindicadas em pediatria(115). No entanto, têm uma excelente biodisponibilidade e difusão tissular, pelo que poderão ser consideradas em infecções graves, resistentes à terapêutica e em crianças maiores(115). Uma criança com osteomielite persistente acabou por fazer esta terapêutica oral com boa resposta.

## **5.2 Susceptibilidade antimicrobiana**

Segundo os dados do programa de vigilância à resistência antimicrobiana (SENTRY), em 2287 estirpes de SAMS isoladas na Europa, 84,7% eram resistentes à penicilina, 22,5% à eritromicina, 6,3% à clindamicina e 10% à ciprofloxacina(40). Bernard *et al*, num estudo prospectivo, multicêntrico, realizado entre 2003 a 2004, em 205 SA isolados de IP adquiridas na comunidade, verificaram que só 6,8% eram sensíveis a todos os antibióticos testados, 86% eram resistentes à penicilina, 5,8% à meticilina, 32% à eritromicina, 3,4% à clindamicina, 9,3% à ciprofloxacina, 5,8% à tetraciclina e 0,5% à gentamicina(10).

Neste estudo, a percentagem de resistência à penicilina (84,3%) e clindamicina (7,1%) foi sobreponível. Contudo, a resistência à eritromicina (12,9%) e ciprofloxacina (2,9%) foi inferior.

A baixa resistência à eritromicina, poderá ter sido enviesada pelo número reduzido da amostra, embora possa estar relacionado com uma redução da prescrição destes antibióticos em infecções cutâneas, tal como sugerido por Melo Cristino *et al*, em infecções por *Streptococcus pyogenes* em Portugal(125).

Schmitz *et al*, num estudo multicêntrico, verificaram que o mecanismo mais frequente de resistência à eritromicina em estirpes de SAMS era a aquisição do gene *ermC* (56%), um dos responsável pelo fenótipo iMLSB(120). Neste estudo, apesar da percentagem do fenótipo iMLSB ter sido semelhante (55%), não foi feito o estudo genético o que limita as interpretações. Não detectamos, o fenótipo constitutivo, ao contrário do habitualmente descrito(120).

A clindamicina actua sobre a bactéria em fase de crescimento estacionário, inibe a síntese proteica, comprometendo a síntese de toxinas e proteína M, favorecendo a opsonização bacteriana, sendo uma excelente opção terapêutica(95).A terapêutica empírica das infecções por SA com clindamicina depende da resistência local. Se for superior a 10 a 15%, a sua utilização fica limitada(65). Neste estudo, detectamos 7,1 % de estirpes resistentes à clindamicina (fenótipo iMLSB), o que permite, por enquanto, a sua utilização empírica, com sucesso. De facto, todos os doentes com infecção por SA que iniciaram clindamicina mantiveram a terapêutica, não se verificando falência clínica.

Não deixa de ser curioso que a clindamicina só tenha sido prescrita em doentes com IP e não nas infecções invasivas. Estas diferenças estão provavelmente relacionadas com as características de prescrição antimicrobiana de cada equipa médica e não com a infecção em si. Contudo, a utilização regrada de clindamicina nas infecções por estirpes SAMS tem a vantagem de guardar este antimicrobiano para as infecções por estirpes resistentes, nomeadamente à meticilina(72).

O TMP-SMX parece ter uma actividade bactericida excelente nos isolados SA susceptíveis, independentemente da resistência à meticilina(115). Neste estudo nenhum era resistente ao TMP-SMX, o que permite a sua prescrição com sucesso.

A resistência à ciprofloxacina tem aumentado nas últimas décadas, sobretudo em estirpes resistente à meticilina(115). Neste estudo a resistência à ciprofloxacina foi baixa (apenas 2 estirpes detectadas em 2008), o que não parece estar de acordo com o consumo deste antimicrobiano em Portugal(38). No entanto, em estirpes de SAMS a resistência a quinolonas é em geral baixa(40).

A rifampicina é uma boa opção terapêutica em associação com outros antimicrobianos, sobretudo nas estirpes resistentes(115). Neste estudo a resistência a este fármaco foi baixa (1,4%), o que possibilita a sua aplicação nas infecções mais graves.

Em França a resistência ao ácido fusídico permanece estável (5-10%), ao contrário do Reino Unido em que ultrapassa os 20%(17). Neste estudo não testámos a susceptibilidade ao ácido fusídico e à mupirocina, o que poderia ter importância na terapêutica tópica e na erradicação da colonização(115).

A resistência à meticilina será discutida no capítulo seguinte.

### **5.3 Resistência à metilicina**

A resistência à metilicina na comunidade representa uma alteração completa da epidemiologia das infecções por SA(64). A disseminação de clones de SAMR-AC é uma realidade mundial, contudo a prevalência e epidemiologia molecular variam de continente para continente(63, 110, 130).

Nos EUA a percentagem de SAMR-AC varia entre 9 a 20%, chegando a atingir os 76% no Texas (67). Na Europa, a prevalência mantém-se em geral baixa, entre 0,4 a 1%(110, 117, 137). Em França, observou-se um ligeiro aumento, de 3,9% para 5,8%, entre 2000 e 2004 (110). Em Portugal, apesar de já terem sido descritas estirpes de SAMR-AC (3, 113), a percentagem global de SAMR-AC permanece desconhecida.

Del Giudice *et al*, num estudo prospectivo realizado no Sul de França, entre 1999 a 2004, em crianças hospitalizadas, identificaram 6/207 (3%) crianças com SAMR-AC. No nosso estudo foram encontradas 3 estirpes SAMR-AC (1,3%), sobreponível ao encontrado na Europa.

#### **5.3.1 Factores de risco**

São considerados factores de risco associados à aquisição SAMR-AC, a idade inferior a 2 anos, a origem africana, um nível de higiene deficiente e factores que facilitam a promiscuidade, como a frequência de creches, grupos desportivos, quartéis ou prisões. A história de síndrome gripal, infecções recorrentes por SA ou infecções anteriores por SAMR-CA são factores adicionais(99). Também o consumo de antibióticos, em particular quinolonas e macrólidos, foi associado ao isolamento de SAMR-AC(121). Contudo, mesmo nos países com elevada prevalência SAMR-AC, como os EUA, a



presença ou ausência destes factores não é útil para distinguir doentes com SAMS de SAMR(62, 92). Na Europa é provável que, com excepção da origem africana, viagem recente para africa ou EUA ou colonização por SAMR, estes factores não sejam ainda relevantes(99, 117).

Neste estudo nenhum doente com SAMR referia frequência de actividades desportivas, dois não frequentavam a creche.

Nos EUA a frequência de SAMR varia consoante a origem geográfica dos doentes: 43% se origem africana vs 17% se caucasiana(42). Esta associação com a origem africana poderá estar relacionada com a maior frequência de alguns clones, como o USA 300, na população oriunda de África (42). Igualmente em França, o clone ST-80, responsável por infecções na comunidade foi associado à origem africana(32). No nosso estudo, contudo, nenhum era de origem africana.

Tem sido descrita um aumento do número de infecções por SAMR com características moleculares da comunidade em Maternidades e Unidades de Neonatologia, o que está de acordo com o nosso estudo, com um número maior de recém-nascidos no grupo SAMR(14, 91). Neste estudo, um dos recém-nascidos, tinha estado internado após o nascimento e o irmão gémeo mantinha-se internado na altura da admissão, pelo que não se pode excluir a origem hospitalar desta estirpe.

### **5.3.2. Clínica**

Naimi *et al* compararam estirpes de SAMR-AC e demonstraram que estas estirpes tinham mais frequentemente sete genes responsáveis pela produção de diferentes exotoxinas, que incluíam a LPV, *sea*, *seb*, *sec*, *seh* e *sek*(130). Este complemento genético explica a semelhança entre o quadro clínico das infecções por estirpes de

SAMS-AC e SAMR-AC e diferencia-as das nosocomiais (que produzem menos toxinas).

As infecções da pele e tecido celular subcutâneo correspondem a 95% dos casos e incluem celulite, abscessos e foliculites(42, 57). A localização é variável, embora as extremidades, tronco e períneo, sejam particularmente afectadas. Na infância, as nádegas e o períneo são especialmente atingidas(91). Recentemente foram descritas infecções da cabeça e pescoço, nomeadamente linfadenites cervicais, infecções peri-orbitárias, otite externa e mastoidite, o que não foi encontrado no nosso estudo(64, 103). Apenas uma estirpe responsável por IP era resistente à metilina e correspondia a uma linfadenite inguinal com abscesso num recém-nascido.

Embora menos frequente a doença invasiva por SAMR-AC tem também aumentado, nomeadamente as infecções osteo-articulares, pneumonias e piomiosites(32, 67). Os quadros são por vezes graves, sépticos e com envolvimento múlti-orgânico(47, 85). No trabalho realizado, nos dois doentes com infecção invasiva por SAMR, ambos apresentavam envolvimento muscular e um deles com osteomielite concomitante.

É rara a apresentação clínica sob a forma de bacteriémia/*sepsis* sem foco, ao contrário do que acontece nas infecções por SAMS e nosocomiais(57), tal como observamos neste trabalho.

A gravidade das infecções por SAMR-AC não é completamente conhecida(72). As estirpes SAMR-AC não parecem ser mais virulentas do que as SAMS, embora seja provável que a ineficácia terapêutica possa interferir no prognóstico(72). No estudo de Davies *et al*, 46% dos doentes com estirpes de SAMR-AC eram internados *versus* 18% dos SAMS, o que sugere uma maior gravidade dos primeiros(25). Também no Texas,

61% *versus* 53% das IP respectivamente por SAMR-AC e SAMS-AC foram hospitalizadas(91). No entanto, em alguns doentes já era conhecido o antibiograma antes da admissão hospitalar, o que se poderá condicionar a abordagem.

Nas últimas décadas, têm sido descritas formas mais graves de pneumonias, *sepsis* e infecções musculoesqueléticas associadas a SAMR-AC(44, 63). No entanto, as estirpes implicadas são muitas vezes produtoras de LPV e têm um perfil clonal semelhante (como USA 300), o que compromete as interpretações(47, 85, 91). Neste estudo não encontramos qualquer diferença entre a persistência da febre, número de dias de cultura positiva, duração da hospitalização ou complicações que traduzam uma maior gravidade do quadro clínico nas estirpes SAMR.

### **5.3.3. Susceptibilidade a outros antimicrobianos**

A emergência de SAMR-AC tem levado ao aparecimento de orientações terapêuticas empíricas alternativas(65, 85). Vários países têm proposto um algoritmo para o tratamento destas infecções(7, 99). Os clínicos devem conhecer a prevalência de SAMR-AC na comunidade, bem como o padrão de susceptibilidade local, de modo a adequar a terapêutica empírica(72).

O perfil de resistência das estirpes de SAMR-AC aos outros antimicrobianos é habitualmente simples. Naimi *et al*, em 131 estirpes SAMR-AC, verificaram que eram frequentemente susceptíveis à ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina e gentamicina ao contrário das estirpes hospitalares(97). Também Vandenesch *et al*, num estudo que inclui estirpes de diferentes continentes, mostrou que eram em geral sensíveis a outros antimicrobianos, embora as estirpes Europeias parecessem ser ligeiramente mais resistentes(130). Preocupante tem sido o facto de esta susceptibilidade estar a

decrecer(100). No nosso estudo, excluindo a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, a comparação entre os perfis de resistência das estirpes SAMR e SAMS foi semelhante. A resistência à eritromicina foi apenas detectada numa estirpe SAMR, com fenotipo iMLSB, e a resistência à ciprofloxacina noutra estirpe. Este perfil de susceptibilidade permite a utilização de uma variedade de agentes antimicrobianos, que não a vancomicina, para este tipo de infecções.

As estirpes da comunidade não apresentam, por enquanto, resistência à vancomicina, o que está de acordo com os resultados encontrados. No entanto, o número de estirpes sensíveis à vancomicina, mas com concentrações inibitórias mínimas (CIM) entre 1 e 1,5 mg/ml tem aumentado nos últimos anos(99). Estas estirpes têm sido associadas a falências terapêuticas com vancomicina, pelo que é fundamental o conhecimento destes valores para orientar a terapêutica, o que não foi feito para as estirpes SAMR neste trabalho. Por outro lado, mesmo nas estirpes sensíveis à meticilina, está provado que a vancomicina em monoterapia é menos eficaz que a flucloxacilina (33). Deste modo, a prescrição de vancomicina quando a evolução não é favorável, sobretudo em monoterapia, deve ser desencorajada.

#### **5.3.4. Terapêutica**

Nas **IP** por SAMR-AC a abordagem terapêutica óptima é pouco clara(76). A incisão e drenagem das lesões com flutuação, sem terapêutica antimicrobiana associada, parece ser eficaz em abscessos com menos de 5 cm de diâmetro(76). Contudo, mesmo nestes casos a terapêutica antimicrobiana é geralmente prescrita, o que dificulta comparações(64). Kaplan *et al* sugere que em infecções ligeiras o prognóstico seja semelhante, independentemente da terapêutica antimicrobiana adequada(65). Pelo

contrário, Ruhe *et al*, num estudo retrospectivo sobre o impacto da terapêutica antimicrobiana empírica no prognóstico de IP, mostraram um significativo aumento da falência terapêutica no grupo dos doentes não susceptíveis(112). Também Davis *et al*, num estudo prospectivo em adultos em Chicago, verificaram que os doentes com SAMR-AC que recebiam terapêutica adequada mais frequentemente evoluíam para cura clínica que os que recebiam terapêutica para o qual o microrganismo não era susceptível(25). Estas discrepâncias poderão estar relacionadas com tamanho da amostra, tipo de abordagem cirúrgica, características de comunidades diferentes e dos sistemas de saúde. No nosso estudo, o único doente internado por IP a SAMR não fez uma terapêutica antimicrobiana bactericida (estava medicado com flucloxacilina, para a qual não era susceptível, e gentamicina, antimicrobiano com actividade bacteriostática), apresentando uma evolução favorável, o que está em acordo com os resultados de Kaplan *et al*(65).

Nas IP por SAMR-AC de maiores dimensões, a terapêutica oral com trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) ou clindamicina tem sido recomendada, com bons resultados(59). Um dos problemas do TMP-SMX é não ser activo contra *Streptococcus pyogenes*, o que limita utilização empírica no tratamento das IP, e por outro lado, a possibilidade de efeitos secundários graves, como reacções de hipersensibilidade ou supressão da medula óssea (64). Em adolescentes, a terapêutica com doxiciclina ou ácido fusídico, associados ou não à rifampicina, são outras opções(63). Neste estudo, o único doente com IP por SAMR era concomitantemente resistente à ciprofloxacina, pelo que poderia ter beneficiado com a prescrição de clindamicina ou TMP-SMX, o que não aconteceu (como referido acima estava medicado com flucloxacilina e gentamicina).

Na **doença invasiva** a terapêutica deve ser agressiva, pois a mortalidade chega a atingir os 20-25% sob terapêutica antimicrobiana adequada(42). Schramm *et al*, em doentes com bacteriemia por SAMR que receberam um tratamento empírico não adequado ( $\beta$ -lactâmicos), a duração do internamento e da antibioticoterapia e a mortalidade foram significativamente superiores em relação aos doentes com SAMR que receberam terapêutica adequada(122). Neste estudo, uma doente com abscesso do psoas e bacteriemia não recebeu terapêutica adequada e teve uma boa evolução, o que contraria estes dados e poderá estar relacionado com a eficácia da abordagem cirúrgica.

Na infecção invasiva têm sido utilizados vários esquemas terapêuticos, que incluem clindamicina, vancomicina, linezolid, rifampicina e cotrimoxazol(65).

A clindamicina parece ser útil na doença invasiva grave por SAMR, incluindo osteomielite, artrite séptica e empiema pleural(50). O TMP-SMX parece ser eficaz sobretudo em infecções em que a carga bacteriana efectiva é baixa, pelo que não deve ser utilizado em monoterapia em endocardites, bacteriemia ou infecções musculoesqueléticas(72). A rifampicina actua sinergicamente com outros antibióticos e apresenta um índice alto de difusão pelo que parece ser importante como terapêutica adjuvante em doença invasiva(72).

Como já referido, a terapêutica com vancomicina para as infecções invasivas coloca algumas questões, relacionadas com a eficácia terapêutica. Esta eficácia parece ser inferior à dos  $\beta$ -lactâmicos, com maior frequência de recaídas e maior duração da bacteriemia(65, 72), sobretudo para as estirpes com CIM para a vancomicina entre 1mg/l a 1,5mg/l(99).

Assim, quando se administra a vancomicina, um segundo agente sinérgico como a gentamicina ou a rifampicina, deve ser utilizado em associação e a terapêutica deve ser individualizada e baseada na concentração sérica. Quando a CIM é superior a 1mg/l (mas inferior a 1,5mg/l), recomenda-se a administração em perfusão contínua para manter níveis séricos de 15 a 20mg/l em vale (obtidos em vale após a 4ª dose) nas primeiras 48 a 72 horas de terapêutica(99).

A daptomicina e a tigeciclina poderão ser outras opções, sobretudo em adultos (4). O linezolid é uma oxazolidenona, que parece ser equivalente ou superior à vancomicina no tratamento de infecções graves por SAMR, incluindo bacteriemia e pneumonia(66). Também parece ser eficaz nas osteomielites e encontra-se disponível em formulação oral(72). No nosso estudo estes antimicrobianos não foram utilizados, não estando ainda aprovados para a idade pediátrica.

Tendo em conta os agentes disponíveis, na doença invasiva por SAMR-AC de gravidade ligeira a moderada, e quando a resistência local é inferior a 10-15%, a clindamicina é uma boa opção, após confirmação da ausência de resistência indutível. Também o TMP-SMX poderá ser utilizado, associado a outro antimicrobiano, quando a carga bacteriana não é elevada(65).

Na doença invasiva grave, tem sido sugerida a terapêutica empírica com clindamicina ou vancomicina associada a cefalosporinas de terceira geração(66). No Texas, tem sido utilizada a vancomicina associada a um aminoglicosídeo ou à rifampicina (64). No Reino Unido, é recomendada a utilização de linezolid combinada com clindamicina e rifampicina, baseados na sinergia *in vitro* e na inibição da produção de toxinas em relação aos dois primeiros fármacos(99). No nosso estudo, dos dois doentes com doença

invasiva por SAMR, de gravidade moderada, em nenhum foi utilizada a clindamicina ou o TMP-SMX. Um doente com osteomielite fez vancomicina (40mg/Kg/dia) associada à gentamicina, com boa evolução, mas manteve bacteriemia durante 9 dias após o início da terapêutica, o que poderá estar relacionado com a baixa eficácia deste fármaco.

### **5.3.5. Relação genótipo/fenótipo**

Nas 3 estirpes resistentes à meticilina detectou-se a presença do gene *mecA*. No entanto, a relação entre o fenótipo e o genótipo de resistência à meticilina não é linear. Bressler *et al* descreveu estirpes de SA portadoras de *mecA* mas susceptíveis à meticilina(15). Nakaminami *et al*, em 347 doentes com impétigo, verificaram que 12% das estirpes de SAMS eram *mecA* positivas (98). O mesmo autor descreve duas estirpes com resistência *borderline* à oxacilina, na ausência de *mecA*, por uma possível alteração indução do sinal(98). No nosso estudo, não foram encontradas estas alterações, verificando-se concordância entre o fenótipo e o genótipo.

Têm sido descrito um padrão de resistência heterogênea à meticilina em estirpes *mecA* positivas, com expressão fenotípica variável de susceptibilidade à meticilina, em escada(116). Neste estudo não foi feita uma avaliação quantitativa da resistência à oxacilina, de modo a avaliar este problema, como tem sido sugerido.

## **5.4 Análise clonal (PFGE e spa type)**

Em estudos epidemiológicos a utilização de métodos de tipagem moleculares é prática corrente. Enright *et al* propuseram que os clones SAMR sejam designados consoante a



tipagem MLST e SCCmec, metodologia que não foi utilizada e que poderá representar uma limitação do nosso estudo(35). O SCCmec tipo IV tem sido associado às estirpes SAMR-AC, pelo que a tipagem SCCmec poderia ajudar a confirmar a proveniência da comunidade. Contudo, já têm sido descritas estirpes hospitalares SCCmec tipo IV e da comunidade SCCmec tipo II ou III, o que limita o papel deste método molecular.

Faria *et al*, compararam vários métodos de tipagem e verificaram que o PFGE era a técnica mais discriminatória, sobretudo para as estirpes SAMS e que os resultados eram sobreponíveis a outros métodos como o spa typing ou o MLST(36). Por esta razão, optámos pelo PFGE, associado ao *spa typing* apenas nas estirpes SAMR.

A maioria dos estudos mostra que as infecções por SAMS com origem na comunidade têm perfis clonais diversos, com diversas estirpes a circular localmente(92). Davis *et al* analisaram 102 estirpes SAMS e verificaram que se distribuíam por 33 perfis clonais diferentes(25). Também Aires de Sousa *et al*, em 312 estirpes SAMS provenientes da comunidade, em portadores saudáveis portugueses, detectaram 20 perfis clonais diferentes(1). Neste estudo, encontramos 15 perfis clonais diferentes o que está de acordo com o descrito. Os nossos resultados também sugerem uma semelhança genética entre as estirpes isoladas de doença invasiva e não invasiva, tal como previamente descrito(87).

A relação clonal entre as estirpes de SAMS e SAMR-AC em circulação não é bem conhecida(67, 87). Tenover *et al*, nos EUA, em estudos realizados em populações específicas, como atletas, militares ou em creches mostraram que as estirpes de SAMR-AC pertenciam ao mesmo perfil clonal por PFGE(129). A estirpe geralmente implicada, designada por USA 300, disseminou-se rapidamente nos EUA, tendo já sido

identificada em infecções por SAMS-AC(129). Estes achados traduzem a importância desta estirpe especialmente virulenta, independentemente da aquisição ou não do gene *mecA*(87). Também Vandenech *et al*, utilizando estirpes SAMR-AC provenientes de vários continentes, verificaram que se agrupavam em seis complexos clonais diferentes, com uma clara distribuição continental, não se correlacionando com as estirpes hospitalares locais(130). No entanto, nestes estudos as estirpes europeias e americanas foram muitas vezes colhidas em doentes provenientes de locais particulares (como creches, ginásios ou prisões), sendo muitas vezes escolhidas com base em características moleculares, e não clínicas pelo que a homogeneidade das estirpes poderá ser artificial.

Pelo contrário, Davies *et al*, num estudo de caso-controlo realizado nos EUA em 2007, demonstraram que as estirpes de SAMR-AC tinham uma maior diversidade genética do que previamente descrito, sendo muitas delas LPV negativas e não pertencentes a clones previamente classificadas por McDougal *et al* (em 22% dos casos)(25, 88). De facto a emergência de SAMR-AC não parece ser por disseminação de um único clone, mas pelo aparecimento de estirpes diferentes em cada país e de forma independente.

No nosso estudo, analisando as estirpes consoante a resistência à meticilina verificamos que as estirpes de SAMS se distribuíam pelos 15 clones principais e que também as estirpes de SAMR se dividiam por 3 clones, por PFGE e por *spa typing*, comprovando a sua diversidade genética.

Apesar de inicialmente se ter sugerido a origem hospitalar das estirpes SAMR-AC(3, 35), a susceptibilidade paradoxal aos antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos, a associação com síndromes clínicas classicamente associados a estirpes SAMS e as diferenças

genotípicas entre SAMR-AC e SAMR-HA, levou à admissão de que estirpes SAMR-AC evoluíram de estirpes SAMS endêmicas na comunidade(57). A emergência de estirpes com diferentes ancestrais genéticos provenientes de SAMS, mas com frequência portadores de LPV e de uma cassete de resistência à metilicina muito pequena (tipo IV) sugere uma pressão selectiva global (130).

Os nossos dados igualmente sugerem, apesar das limitações comparativas (não efectuamos MLST, tipagem SCCmec ou *spa typing* às estirpes SAMS), uma semelhança genética entre as estirpes SAMR e SAMS. De facto, uma estirpe de SAMR pertence ao clone de PFGE tipo H, em conjunto com outras de SAMS. Por outro lado, se utilizarmos um coeficiente Dice de 77%, as outras duas estirpes de SAMR ficam agrupadas em clones (PFGE tipo G e O) em conjunto com outras estirpes SAMS. Esta semelhança reforça a noção de que a aquisição de SCCmec por SA se estabeleceu na comunidade(93).

Vandenesch *et al* encontraram quatro tipos predominantes de SAMR-AC, todos LPV positivos: ST-1 e ST-8, nos EUA; ST-30 na Oceânia e ST80 na Europa (130). Outros clones SAMR-AC foram já descritos na Europa, nomeadamente ST-5, ST-9, ST-22 e ST-50(137)

Em França, a maioria das estirpes SAMR-AC pertencem ao clone Europeu (ST80), com uma prevalência de 3,6% em 2008, o que aponta para a sua disseminação (24). Nenhuma das nossas estirpes parece pertencer a este clone uma vez que nenhuma era LPV positiva ou pertencia ao *spa type* t044, descrito como associado a este clone(24).

Uma das estirpes isoladas, PFGE tipo H, *spa type* t008, parece apresentar algumas semelhanças com o clone Lyon e USA 300, ambos *spa type* t008.

O clone *Lyon*, ST 8, *spa type* t008, SCCmec tipo IV, LPV negativo, tem sido sobretudo associado a infecções relacionadas com cuidados de saúde, embora já tenham sido identificadas várias estirpes adquiridas na comunidade(24). Uma das características deste clone é a presença do gene *sea*, que parece transportar uma ilha de patogenicidade capaz de modular o sistema imune humano. Contudo a nossa estirpe tem um perfil fenotípico de resistência aos antimicrobianos diferente do clone *Lyon*, não sendo resistente às quinolonas.

O clone USA 300 (ST8, SCCmecIV) parece ter várias semelhanças com o clone *Lyon* (ST8, SCCmec IV)(35). Contudo, as estirpes USA 300 tem um perfil de resistências completamente diferente, são produtoras de LPV e estão geralmente associadas a infecções adquiridas na comunidade. Diep *et al* sequenciaram o genoma das estirpes USA 300 e demonstraram a presença de uma ilha genómica, com o elemento móvel para o catabolismo da arginina (ACME), que contém uma série de genes implicados no metabolismo da arginina, com potencial patogénico(29). No entanto, a ausência deste elemento em estirpes de SAMS USA300 responsáveis por doença invasiva sugere que não tenha um papel patogénico essencial(29). Whitte *et al*, na Alemanha detectaram 23 estirpes de SAMR-AC, ST-8, LPV positivas, provavelmente importadas dos EUA e relacionadas com o clone USA 300(137), sendo de prever um aumento da prevalência destas estirpes na Europa nos próximos anos.

Outra das estirpes isoladas, com um perfil clonal único por PFGE, *spa type* t022 poderá estar relacionada com os clones ST-22 e EMRSA-15. Apesar do clone ST22 estar sobretudo associado a estirpes hospitalares, sendo o principal clone identificado na Bélgica, Irlanda e Alemanha, já foi descrito em infecções por SAMR-AC em vários países(24, 111). O clone EMRSA-15 (ST-22, SCCmec IV) é um dos principais clones

associados a infecção nosocomial e tem um padrão de resistência característico sobreponível ao da nossa estirpe (resistente aos  $\beta$ -lactâmicos e ciprofloxacina)(1). De facto, no estudo efectuado a distinção entre SAMR-HA e SAMR-AC foi feita com base em critérios epidemiológicos, sendo a fronteira difícil de avaliar. O doente de quem foi isolado esta estirpe era recém-nascido, tendo estado em ambiente hospitalar alguns dias antes do internamento, e tinha o irmão gêmeo internado desde o nascimento, pelo que a origem hospitalar não pode realmente ser excluída, o que está de acordo com estes dados moleculares.

A outra estirpe isolada, perfil clonal único por PFGE, *spa type* t062, parece apresentar algumas semelhanças com o clone ST-5, isolado preferencialmente de estirpes hospitalares, pelo que mais uma vez pelo perfil clonal não pode ser excluída a origem hospitalar desta estirpe, também isolada num recém-nascido transferido de outro hospital. O clone Pediátrico (ST-5, SCCmed tipo IV, agr2) foi descrito pela primeira vez no Hospital Dona Estefânia em 1992 e posteriormente detectado noutros países(114). Contudo, está geralmente associado a *spa type* t311 ou outros relacionados (t045, t067, t509, t2173, t1818), e à resistência à ciprofloxacina, o que não acontece no nosso caso. A inclusão de estirpes representativas deste clone no PFGE teria sido útil na interpretação dos resultados.

### **5.5 Leucocidina de Pantón- Valentine**

A relação entre a presença do LPV e a clonalidade de SA da comunidade ainda não está completamente esclarecida. Holmes *et al*, no Reino Unido, verificaram que as estirpes

LPV positivas provinham de clones diferentes, embora o ST-80 fosse predominante(58). Neste estudo, verificamos que as estirpes LPV positivas se distribuíam por vários clones e que a maioria destes clones incluía estirpes LPV negativas. O facto de o LPV ser transportado por diferentes fagos poderá explicar esta diversidade.

Esta emergência a nível mundial de estirpes produtoras de LPV, com origem clonal diferente, sugere que este factor tenha alguma vantagem adicional. Não parece haver dúvida que induz dermonecrose quando injectado por via intradérmica em coelhos, contudo, o papel na doença invasiva, como na *sepsis* ou pneumonia é mais difícil de demonstrar(134).

Labandeira-Rey *et al*, em estudos experimentais em ratos, utilizaram estirpes isogénicas de SAMS, LPV positivas e negativas, e verificaram que as LPV positivas provocavam pneumonia necrotizante mais grave, provocando destruição tecidual maciça(71). Na análise por *microarrays* demonstraram que este gene estava envolvido na expressão concomitante de outras proteínas, como as MSCRAMMs e a proteína *Spa*, factores que poderão ser responsáveis pela virulência das estirpes LPV positivas. Contudo, este autor só utilizou uma única estirpe SAMS, o que limita as conclusões(71). Brown *et al* demonstraram que a administração intranasal de subunidades de LPV parece proteger o rato da pneumonia, sugerindo mais uma vez a importância deste factor(16).

Pelo contrário, Voyich *et al*, comparando estirpes isogénicas de SAMR LPV positivas e negativas em ratos, verificaram uma virulência semelhante(132). Said-Salim *et al* também não encontraram diferenças na lise de leucocitos polimorfonucleares entre estirpe de SAMR LPV positivas e negativas.

É provável que diferenças no tipo de estirpe utilizada, nos níveis de expressão de LPV (mais baixos no estudo de Voyich) e nos modelos animais justifiquem estas divergências. Se, de facto, a LPV é um factor de virulência importante ou apenas um marcador de outros factores continua por demonstrar(11, 109, 130).

Na Europa, menos de 5% das estirpes de SA são portadoras de LPV(109). Dufour *et al* detectaram a presença de LPV em 14% das estirpes clínicas em França, a maioria susceptíveis à meticilina(32, 79). No Reino Unido, a prevalência de estirpes LPV positivas foi baixa (1,6%), sendo mais frequente em SAMS(58). Em Espanha, identificaram-se alguns clones LPV positivos em Madrid, maioritariamente em população emigrante da América do Sul(83). Aires de Sousa *et al*, num estudo realizado em Lisboa e Porto, encontraram a LPV em apenas 2,3% das estirpes de SAMS(1). No nosso estudo 22,9% das estirpes eram produtoras de LPV, todas susceptíveis à meticilina, o que poderá traduzir um aumento da prevalência deste factor na nossa população, embora o número de estirpes provenientes de IP (n=35) condicione os resultados.

No Texas, tem sido reportado um aumento de pneumonias, *sepsis* e infecções osteo-articulares por estirpes LPV positivas em adolescentes. No nosso estudo, nenhum era adolescente.

A história de traumatismo não parece estar associado à infecção por estirpes de SA produtores de LPV(85). Pelo contrário, Parannaj *et al*, num estudo referente a miosites demonstraram que a presença de LPV era mais frequente quando havia história de traumatismo(47, 105). No nosso estudo, também verificámos esta relação.

Lina *et al* determinaram a presença de LPV em 172 estirpes clínicas de SA provenientes de diferentes tipos de infecção(79). A LPV estava significativamente associada a furúnculos (93%), celulites (55%), abscessos (50%) e pneumonias adquiridas na comunidade (83%), não tendo sido encontrada em outras estirpes responsáveis por infecções invasivas como endocardite, choque tóxico estafilocócico ou mediastinite(79). Também Diep *et al* referiram uma associação semelhante entre a LPV e IP, o que está de acordo com os resultados obtidos no nosso estudo(30). De facto, tem sido sugerido que a LPV será mais importante nas doenças em que o mecanismo é por invasão directa e destruição local (infecções de pele e pneumonias) do que nas infecções secundárias (metastáticas)(79).

McCaskill *et al*, no Texas, estudaram 117 estirpes SAMS-AC implicadas em doença invasiva, encontrando 39 (33%) LPV positivas(87). Verificaram que excluindo as estirpes USA 300 (muito frequentes nos EUA, mas ausentes entre nós), as outras estirpes se distribuíam por vários perfis clonais e que apenas 11,6% eram LPV positivas(87), percentagem que se assemelha à encontrada por nós na doença invasiva (8,5%). Couppie *et al*, detectaram LPV em apenas 1 de 86 (1,2%) estirpes isoladas no sangue, o que está de acordo com os nossos resultados em que não encontramos nenhuma bacteriémia LPV positiva(23).

As infecções por SA produtor de LPV têm sido associada a infecções mais graves, com foco detectável, mas com maior número de bacteriemias, maior duração da hospitalização e maior número de sequelas(31, 44). Neste estudo, comparando as IP LPV positivas e negativas, não verificámos diferenças em relação à clínica, duração de internamento, número de antibióticos ou sequelas. Contudo nesta população, a PCR foi significativamente superior no grupo LPV positivo, tal como já descrito. Pelo contrário,



na população com doença invasiva, a duração do internamento foi inferior nas estirpes LPV positivas, o que sugere uma menor gravidade deste tipo de infecção, ao contrário do habitualmente referido. Contudo, nenhuma destas estirpes era concomitantemente meticilino-resistente, pelo que não se pode excluir que existam outros factores de virulência adicionais associados à resistência à meticilina, como já encontrado nas estirpes USA 300 e USA 400, que justifiquem esta má evolução(6, 29).

A terapêutica de infecções invasivas, graves, por SA LPV positivo, deve incluir antibióticos que actuem na expressão da LPV e de outros factores de virulência, como a clindamicina e, em casos extremos, o linezolid(33). De facto, mesmo em concentrações sub-inibitórias a clindamicina e o linezolid parecem promover diminuição da produção desta toxina, ao contrário da flucloxacilina e vancomicina(99, 126).

A imunoglobulina humana policlonal endovenosa tem sido incluída na terapêutica de doentes com *sepsis* grave, com bons resultados(13). Embora as razões para a sua utilização não possam ser directamente atribuídas à presença de anticorpos contra LPV, a imunoglobulina parece ligar-se a este componente.

A forte ligação epidemiológica entre LPV e os clones de SAMR-AC não deixa dúvidas de que a LPV deverá ter papel importante da fisiopatologia da doença(13). No nosso estudo não encontramos contudo qualquer associação entre os dois factores, o que poderá estar relacionado com o pequeno número da amostra, mas também com as particularidades das estirpes mais prevalentes em Portugal.

## **5.6 Situações clínicas especiais**

### **5.6.1 Infecções musculo-esqueléticas**

As infecções musculo-esqueléticas são as infecções invasivas a por SA mais frequentes em crianças. A incidência tem aumentado significativamente nos últimos anos, de 2,6 para 6,0/1000 admissões entre 2000 e 2004 em França (5, 87, 92).

O início é geralmente agudo, a sintomatologia inespecífica, sobretudo nos mais novos, e os parâmetros de inflamação estão com frequência elevados, tal como observado(11).

A radiografia é um exame de primeira linha embora as alterações sejam tardias. De facto, no presente estudo apenas três doentes mostravam alterações radiológicas iniciais. A ressonância magnética é o método de imagem de eleição, principalmente para o diagnóstico das complicações ósseas e do tecido celular subcutâneo(31). No nosso estudo apenas cinco realizaram RMN, sempre que havia critérios de gravidade ou dúvidas no diagnóstico.

São em geral recomendadas 3 a 6 semanas de antibioticoterapia com flucloxacilina associada ou não à gentamicina ou clindamicina(33). A Sociedade Francesa de Pediatria não recomenda a utilização de penicilinas do grupo M nas infecções osteo-articulares, pois os parâmetros farmacodinâmicos são insuficientes, preferindo outros  $\beta$ -lactâmicos, associados ou não à clindamicina(51). No nosso estudo, a maioria dos doentes foi medicado com flucloxacilina e gentamicina, de acordo com o protocolo do serviço e com boa evolução. O pequeno número de estirpes LPV positivas isolados em infecções invasivas provavelmente não justificam ainda, a proposta de novos protocolos que incluam a clindamicina. A rifampicina, em associação, tem excelente penetração óssea, sendo administrada em formas mais resistentes. As quinolonas em pediatria devem ser

reservadas para casos graves, refractários, tendo sido efectuada numa criança com mais de 8 anos.

#### **5.6.1.1. SAMR**

Tal como para SA em geral, as infecções musculo-esqueléticas são as infecções invasivas mais frequentes em crianças com SAMR-AC, representando cerca de 7,5% das infecções por este agente (93). A sua incidência tem aumentado nos últimos anos de 4 para 40% segundo o estudo de Arnold et al(5).

Comparando as infecções osteo-articulares (IOA) de crianças com infecção por SAMS e SAMR, verificamos que as manifestações clínicas são ligeiramente diferentes, sendo com maior frequência multifocais e de evolução mais arrastada nas estirpes de SAMR(67). Martinez-Aguilar *et al* encontraram uma maior duração da febre e da hospitalização, bem como uma maior probabilidade de evolução para osteomielite crónica nas infecções por SAMR(64). Contudo, utilizando um modelo de regressão logística, e após ajuste para a presença ou ausência de LPV, a percentagem geral de complicações e o prognóstico foi semelhante nos dois grupos (SAMS e SAMR), tal como aconteceu no nosso estudo. Contudo, no nosso estudo o número é pequeno e as diferenças não significativas, embora o doente com osteomielite por SAMR apresentasse um quadro séptico, com envolvimento ósseo extenso, vários focos de infecção e piomiosite, de acordo com o descrito. Não encontramos nenhuma evolução para osteomielite crónica o que poderá estar relacionado com a exclusão exaustiva, e talvez excessiva, de doentes com o diagnóstico de admissão de osteomielite crónica, muitos deles transferidos de outros hospitais.

Uma outra característica das infecções por SAMR é a frequência de piomiosite, habitualmente multifocal e com osteomielite concomitante, tal como encontrámos num caso(85, 105). A piomiosite era tradicionalmente observada em países tropicais, e só raramente em climas temperados(91). As modificações climáticas poderão estar implicadas no aparecimento deste tipo de infecções em climas temperados. Lisboa é uma cidade quente, com temperaturas médias no verão de 21,2°C. No entanto, os 2 casos identificados ocorreram no verão de 2007 (Julho e agosto), altura em que as temperaturas médias em Lisboa foram as mais baixas dos últimos 20 anos, pelo que as alterações climáticas poderão não justificar plenamente estes dados (dados do Instituto Meteorologia de Portugal, disponível em [www.meteo.pt](http://www.meteo.pt)). É frequente o exercício físico vigoroso preceder a miosite, bem como a administração prévia de AINEs, o que não aconteceu em nenhum dos 2 casos(105). A ressonância magnética é útil nestas situações, para detectar os vários focos de infecção, tal como aconteceu num dos casos descritos.

Parannaj *et al* estudaram 26 miosites por SAMR e SAMS e verificaram que, embora o tamanho dos abscessos e o número de intervenções cirúrgicas fosse superior no grupo de SAMR, o número de dias de bacteriémia era superior em SAMS, não se encontrando diferenças em relação à duração da hospitalização(105). Também os nossos resultados sugerem a semelhança dos dois grupos, com igual duração da febre e da hospitalização, número de intervenções cirúrgicas e dias de bacteriémia.

#### **5.6.1.2 LPV**

Lina *et al*, em França, verificaram que 23% das estirpes isoladas de IOA eram produtoras de LPV(79). MacCaskill *et al*, nos EUA, identificaram 25% positivas, não

tendo contudo discriminado o número de estirpes USA 300 (87). Martinez-Aguilar *et al* encontraram 59% (33 de 56) estirpes produtoras de LPV, porém a percentagem era significativamente inferior [24% (6 de 25)] em estirpes SAMS. No nosso estudo obtivemos uma percentagem ainda inferior de estirpes produtoras de LPV em IOA (8,5%), todas meticilino-sensíveis, o que poderá estar relacionado com as diferentes características dos clones isolados e com o pequeno número da amostra.

Embora não esteja provada a associação entre a presença de LPV e as IOA, vários autores descrevem formas mais graves de IOA associadas à presença desta toxina(11, 85, 87). Martinez-Aguilar evidenciou a gravidade de 33 casos de infecção musculoesquelética por estirpes LPV positivas, mas uma percentagem significativa tinha osteomielite crónica na admissão, o que pode enviesar os resultados. Bochini *et al*, no Texas, realçaram a resposta inflamatória excessiva (leucócitos, VS e pCr) e uma maior percentagem de hemoculturas positivas em 59 casos de osteomielite aguda a SA produtor de LPV(11, 85). Dohin *et al*, ao contrário dos resultados de Bochini, verificaram que a contagem média de leucócitos não estava aumentada, estando mesmo diminuída em três doentes, o que os autores relacionam com a presença de LPV, embora a diferença entre os dois grupos não fosse significativa(11, 31). No nosso estudo a diferença também não foi significativa.

Ainda Dohin *et al*, compararam o prognóstico de IOA em crianças infectadas por estirpes LPV negativas e positivas e verificaram que os doentes com estirpes produtores de LPV apresentavam mais dias de febre, maior duração da hospitalização, resposta inflamatória mais intensa e maior frequência de bacteriémia, independentemente da resistência à meticilina(31). Segundo estes autores, o número de complicações foi bastante superior com maior extensão local da osteomielite, maior frequência de

abcessos subperiosteos e intraósseos e fascíte necrotizante, tromboses venosas e evolução para osteomielite crónica(11, 31).

O estudo de Dohin apresenta, contudo, algumas limitações. Nove (64%) estirpes produtoras de LPV tinham adicionalmente genes para outros superantigénios, o que poderá ter influenciado o prognóstico. Por outro lado, a população estudada era relativamente homogénea (com 79% de origem africana), o que poderia estar associado ao predomínio de determinados clones, não tendo sido feito, contudo, qualquer estudo molecular para explicar estes achados(11, 85). Também no estudo de Martinez-Aguilar o predomínio de determinados clones (nomeadamente USA300) poderá ter influenciado os resultados.

No nosso estudo não encontramos diferenças significativas em relação às duas populações, com excepção do número de antibióticos que foi superior nas infecções LPV negativas, sugerindo uma menor gravidade das infecções LPV positivas, ao contrário do que está descrito. Nenhum dos doentes LPV positivos apresentou a abcessos múltiplos ou tromboses venosas, complicações que se admite poderem estar associadas à LPV. Estas diferenças poderão estar relacionadas com os factores já enunciados e com as características da amostra.

### **5.6.2 Pneumonias**

O envolvimento pulmonar está bem descrito em infecções por SA. Em 1982, Chartrand et al descreveram 70 crianças com pneumonia estafilocócica no Texas, cuja forma de apresentação foi pneumonia lobar, com ou sem empiema, tal como descrito no nosso estudo(21).

A pneumonia por SA surge geralmente abaixo dos 2 anos (sobretudo em lactentes), tem uma evolução rápida e está associada a derrame pleural, pneumotórax ou piopneumotórax em 40% dos casos ou pneumatocelos em 85%(21). A mortalidade aproxima-se dos 10% (118).

Nos nossos doentes a idade média foi superior (4,5 anos) e o envolvimento mais frequentemente unilateral. Todos apresentavam derrame pleural e o internamento foi prolongado. Uma das crianças faleceu, o que traduz a gravidade destas pneumonias.

Na pneumonia por SAMS, a terapêutica preconizada inclui um agente  $\beta$ -lactâmico com actividade anti-estafilocócica (oxacilina). A vancomicina em doses convencionais parece atingir concentrações inadequadas no parênquima pulmonar, resultando em mais dias de bacteriémia e maior probabilidade de recaídas em relação aos doentes tratados com oxacilina(48). Neste estudo a maioria dos doentes com pneumonia foi medicado com vancomicina, o que deverá ser desaconselhado.

#### **5.6.2.1 Pneumonias por SAMR**

As pneumonias complicadas com empiema têm sido associadas à emergência de SAMR-AC, sobretudo nos EUA(44, 47, 48). Surgem em 2% dos doentes com infecção por SAMR-AC nos EUA(42). No Texas, SAMR-AC é actualmente a causa mais frequente de empiema pleural em crianças. A apresentação clínica parece ser semelhante, embora a duração da hospitalização pareça ser superior. No nosso estudo, nenhuma das pneumonias era por SAMR- AC.

#### **5.6.2.2 LPV**

Em 1998, o centro de referência francês para as infecções por SA, notificou oito casos de pneumonia grave adquirida na comunidade causada por SA produtores de LPV (79).

Em 2002, um estudo prospectivo sobre as pneumonias da comunidade a SA, permitiu individualizar uma entidade particular, a pneumonia necrotizante associada à produção de LPV(44, 47). Lina *et al* encontraram o gene para a LPV em 85% (23/27) das estirpes isoladas de pneumonia da comunidade(79). Gonzalez *et al* descreveram 14 casos de pneumonia da comunidade por SA LPV positivo, duas necrotizantes(48). Em França, Gillet *et al*, detectaram 16 casos de pneumonia grave, necrotizante, em crianças e adultos jovens, associadas a SA LPV positivo, apenas um resistente à meticilina(44). Entre 1986 e 2005, num estudo multicêntrico que envolveu diferentes países, identificaram-se 57 casos(45). No estudo realizado, o número de estirpes produtoras de LPV em pneumonias foi inferior (20%), tal como no Reino Unido (11%)(58). De salientar que na série de Lina e Gillet os casos eram mais graves, referenciados a um laboratório central, o que poderá não reflectir a prevalência real das estirpes responsáveis por pneumonia na comunidade(79).

Estes doentes têm com maior frequência hemoptises, alteração dos parâmetros vitais, síndrome *influenza-like* a anteceder o quadro (67% vs 9%), contagem leucocitária mais baixa e extensa necrose do tecido pulmonar(44). A duração do internamento hospitalar (média 18,8 dias) e a mortalidade (44%) foram também significativamente superiores(44, 45). A presença de complicações locais, como cavitações e infiltrados multifocais e uma evolução desfavorável, com insuficiência respiratória e choque foram também associados à presença de LPV(44, 45).

Contudo, quando se analisam os dados de Gillet *et al* de 2002 verifica-se que as populações que ele compara como LPV positivas e negativas são muito diferentes. No grupo LPV negativo a idade média (70 anos), os factores de risco e o número de estirpes resistentes à meticilina foi muito superior(44). Um dos dados que nos parece estranho é



a ausência de derrame pleural no grupo LPV negativo, pois na idade pediátrica, a pneumonia por SA cursa frequentemente (40%) com derrame pleural. A comparação de grupos tão díspares poderá levar a conclusões erradas e difíceis de valorizar.

No nosso estudo, o único doente com pneumonia por uma estirpe LPV positiva apresentava um extenso envolvimento pulmonar, com cavitação e hidropiopneumotórax. Também as culturas do derrame pleural se mantiveram positivas 14 dias após o início da antibioterapia. Não se verificaram diferenças significativas em relação à frequência de derrame pleural e aos parâmetros de gravidade em relação às outras pneumonias por estirpes LPV negativas.

As infecções virais do aparelho respiratório, em particular por influenza, parecem facilitar o início da pneumonia bacteriana, especialmente por SA LPV positivo(44, 118). Gonzalez *et al* descreveram 13 doentes com pneumonia, duas das quais necrotizantes, em doentes co-infectados com o vírus influenza A, associação também reportada por Gillet *et al*(44). Nos EUA, em 1918, durante a pandemia de gripe foram descritas pneumonias semelhantes em 385 soldados que faleceram e em que SA foi isolado na autópsia em 153 casos. (44, 47). Será que estas estirpes seriam produtoras de LPV? Ou será que a co-infecção influenza/SA altera de modo significativo o prognóstico da pneumonia, independentemente da presença de LPV? Outros factores como a imunidade do hospedeiro, factores hormonais, expressão proteica poderão ter um papel na gravidade destas infecções.

O prognóstico destas pneumonias é sombrio, com uma mortalidade que se aproxima dos 75%. Gillet *et al*, num estudo mais recente, reportam 50 pneumonias necrotizantes LPV positivas, em que as hemoptises, exantema e leucopénia se associaram a um mau

prognóstico(45). Todos os doentes eram jovens e imunocompetentes. Na nossa observação, o doente com pneumonia causada por uma estirpe LPV positiva, tinha leucopénia, mas não tinha *rash* ou hemoptises e apresentou uma evolução arrastada, mas favorável, sobreponível à das pneumonias causadas por estirpes LPV negativas.

Tal como para SA produtor de LPV em geral, a chave da eficácia terapêutica nestas pneumonias parece ser a inactivação das toxinas, uma vez que a actividade necrotisante persiste após o desaparecimento da bactéria. A clindamicina ou o linezolid ao inibirem a síntese de LPV são as mais adequadas, associadas ou não à imunoglobulina(94). No nosso estudo, a criança com pneumonia LPV positiva foi tratada com ceftriaxona e vancomicina, antibióticos menos adequados para o tratamento destas infecções.

## 6. CONCLUSÕES E PROPOSTAS

Este estudo apresenta várias limitações, é retrospectivo, estuda uma população específica, pediátrica, proveniente de um único hospital e a amostra é reduzida. Inclui um único método de tipagem, com excepção das estirpes de SAMR, e não foi feita a quantificação da resistência à oxacilina, que poderia ter sido útil na clínica. Contudo, apesar das limitações é o primeiro estudo em Portugal em que se determina a percentagem de SAMR-AC e em que se compara as características clínicas e moleculares de SA adquiridos na comunidade.

Numa população que inclui sobretudo SAMS, detectamos infecções invasivas graves, com um predomínio das infecções musculo-esqueléticas.

Encontrámos uma grande diversidade clonal das estirpes da comunidade e não se observou relação entre o tipo clonal e a capacidade invasiva e a susceptibilidade aos antimicrobianos.

A resistência à oxacilina foi sobreponível à de outros países da Europa, com valores entre os 1 e os 2%. Estas estirpes estavam associada a piomiosite e idade inferior a um ano. Tinham um perfil clonal diferente entre elas e não detectamos clone ST-80 (*spa* t044), identificado como o principal clone SAMR-AC na Europa. Encontramos uma estirpe *spa* t008, que tem sido detectada em vários países da Europa e EUA associada a infecções da comunidade.

Confirma-se a presença de clones LPV positivos num número elevado de casos (22%), nomeadamente nas infecções não invasivas. No entanto, não se documenta uma relação

entre a presença de LPV e a gravidade do quadro clínico, nomeadamente nas pneumonias e infeções musculo-esqueléticas.

Será fundamental no futuro monitorizar a prevalência da resistência à oxacilina na comunidade, em estudos prospectivos, e que abranjam diferentes centros hospitalares em Portugal. A patogenecidade das estirpes LPV positivas e SAMR deverá reavaliada, sobretudo na idade pediátrica, população com características mais homogéneas e menos factores de confundimento.



## 7. BIBLIOGRAFIA

1. **Aires de Sousa, M., T. Conceicao, C. Simas, and H. de Lencastre.** 2005. Comparison of genetic backgrounds of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* isolates from Portuguese hospitals and the community. J Clin Microbiol 43:5150-5157.
2. **Aires de Sousa, M., and H. de Lencastre.** 2004. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. FEMS Immunol Med Microbiol 40:101-11.
3. **Aires de Sousa, M., and H. de Lencastre.** 2003. Evolution of sporadic isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals and their similarities to isolates of community-acquired MRSA. J Clin Microbiol 41:3806-3815.
4. **Appelbaum, P. C.** 2007. Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 45 Suppl 3:S165-70.
5. **Arnold, S. R., D. Elias, S. C. Buckingham, E. D. Thomas, E. Novais, A. Arkader, and C. Howard.** 2006. Changing patterns of acute hematogenous osteomyelitis and septic arthritis: emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Pediatr Orthop 26:703-8.
6. **Baba, T., F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K. Aoki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Naimi, H. Kuroda, L. Cui, K. Yamamoto, and K. Hiramatsu.** 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet 359:1819-1827.
7. **Baker, C., Frenck, RW** 2004. Change in management of skin/soft tissue infections needed. AAP News 25:105-117
8. **Berger-Bachi, B., and S. Rohrer.** 2002. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. Arch Microbiol 178:165-71.
9. **Berger-Bachi, B., and M. Tschierske.** 1998. Role of *fem* factors in methicillin resistance. Drug Resist Updat 1:325-35.
10. **Bernard, P., V. Jarlier, and A. Santerre-Henriksen.** 2008. [Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains responsible for community-acquired skin infections]. Ann Dermatol Venereol 135:13-9.
11. **Bocchini, C. E., K. G. Hulten, E. O. Mason, Jr., B. E. Gonzalez, W. A. Hammerman, and S. L. Kaplan.** 2006. Panton-Valentine leukocidin genes are associated with enhanced inflammatory response and local disease in acute hematogenous *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in children. Pediatrics 117:433-440.
12. **Bogaert, D., A. van Belkum, M. Sluiter, A. Luijendijk, R. de Groot, H. C. Rumke, H. A. Verbrugh, and P. W. Hermans.** 2004. Colonisation by

- Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* in healthy children. *Lancet* 363:1871-2.
13. **Boyle-Vavra, S., and R. S. Daum.** 2007. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. *Lab Invest* 87:3-9.
  14. **Bratu, S., A. Eramo, R. Kopec, E. Coughlin, M. Ghitan, R. Yost, E. K. Chapnick, D. Landman, and J. Quale.** 2005. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital nursery and maternity units. *Emerg Infect Dis* 11:808-13.
  15. **Bressler, A. M., T. Williams, E. E. Culler, W. Zhu, D. Lonsway, J. B. Patel, and F. S. Nolte.** 2005. Correlation of penicillin Binding protein 2a detection with oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* and discovery of a novel penicillin binding protein 2a mutation. *J Clin Microbiol* 43:4541-4.
  16. **Brown, E. L., O. Dumitrescu, D. Thomas, C. Badiou, E. M. Koers, P. Choudhury, V. Vazquez, J. Etienne, G. Lina, F. Vandenesch, and M. G. Bowden.** 2009. The Panton-Valentine leukocidin vaccine protects mice against lung and skin infections caused by *Staphylococcus aureus* USA300. *Clin Microbiol Infect* 15:156-64.
  17. **Brown, E. M., and P. Thomas.** 2002. Fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus* isolates. *Lancet* 359:803.
  18. **Carrico, J. A., C. Silva-Costa, J. Melo-Cristino, F. R. Pinto, H. de Lencastre, J. S. Almeida, and M. Ramirez.** 2006. Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. *J Clin Microbiol* 44:2524-32.
  19. **Chambers, H. F.** 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis* 7:178-82.
  20. **Chambers, H. F., and F. R. Deleo.** 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 7:629-41.
  21. **Chartrand, S. A., and G. H. McCracken, Jr.** 1982. Staphylococcal pneumonia in infants and children. *Pediatr Infect Dis* 1:19-23.
  22. **Chung, M., H. de Lencastre, P. Matthews, A. Tomasz, I. Adamsson, M. Aires de Sousa, T. Camou, C. Cocuzza, A. Corso, I. Couto, A. Dominguez, M. Gniadkowski, R. Goering, A. Gomes, K. Kikuchi, A. Marchese, R. Mato, O. Melter, D. Oliveira, R. Palacio, R. Sa-Leao, I. Santos Sanches, J. H. Song, P. T. Tassios, and P. Villari.** 2000. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist* 6:189-198.
  23. **Couppie, P., B. Cribier, and G. Prevost.** 1994. Leukocidin from *Staphylococcus aureus* and cutaneous infections: an epidemiologic study. *Arch Dermatol* 130:1208-9.

24. **Dauwalder, O., G. Lina, G. Durand, M. Bes, H. Meugnier, V. Jarlier, B. Coignard, F. Vandenesch, J. Etienne, and F. Laurent.** 2008. Epidemiology of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones collected in France in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol* 46:3454-8.
25. **Davis, S. L., M. B. Perri, S. M. Donabedian, C. Manierski, A. Singh, D. Vager, N. Z. Haque, K. Speirs, R. R. Muder, B. Robinson-Dunn, M. K. Hayden, and M. J. Zervos.** 2007. Epidemiology and outcomes of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *J Clin Microbiol* 45:1705-11.
26. **De Buyser, M. L., A. Morvan, F. Grimont, and N. el Solh.** 1989. Characterization of *Staphylococcus* species by ribosomal RNA gene restriction patterns. *J Gen Microbiol* 135:989-99.
27. **de Lencastre, H., B. L. de Jonge, P. R. Matthews, and A. Tomasz.** 1994. Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 33:7-24.
28. **Diep, B. A., H. A. Carleton, R. F. Chang, G. F. Sensabaugh, and F. Perdreau-Remington.** 2006. Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 193:1495-503.
29. **Diep, B. A., S. R. Gill, R. F. Chang, T. H. Phan, J. H. Chen, M. G. Davidson, F. Lin, J. Lin, H. A. Carleton, E. F. Mongodin, G. F. Sensabaugh, and F. Perdreau-Remington.** 2006. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 367:731-9.
30. **Diep, B. A., G. F. Sensabaugh, N. S. Somboona, H. A. Carleton, and F. Perdreau-Remington.** 2004. Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Panton-Valentine leukocidin. *J Clin Microbiol* 42:2080-2084.
31. **Dohin, B., Y. Gillet, R. Kohler, G. Lina, F. Vandenesch, P. Vanhems, D. Floret, and J. Etienne.** 2007. Pediatric bone and joint infections caused by Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Infect Dis J* 26:1042-8.
32. **Dufour, P., Y. Gillet, M. Bes, G. Lina, F. Vandenesch, D. Floret, J. Etienne, and H. Richet.** 2002. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Panton-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis* 35:819-824.
33. **Dumitrescu, O., S. Boisset, C. Badiou, M. Bes, Y. Benito, M. E. Reverdy, F. Vandenesch, J. Etienne, and G. Lina.** 2007. Effect of antibiotics on *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1515-1519.
34. **Enright, M. C., N. P. Day, C. E. Davies, S. J. Peacock, and B. G. Spratt.** 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant



- and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 38:1008-15.
35. **Enright, M. C., D. A. Robinson, G. Randle, E. J. Feil, H. Grundmann, and B. G. Spratt.** 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7687-92.
  36. **Faria, N. A., J. A. Carrico, D. C. Oliveira, M. Ramirez, and H. de Lencastre.** 2008. Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 46:136-44.
  37. **Feil, E. J., B. C. Li, D. M. Aanensen, W. P. Hanage, and B. G. Spratt.** 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 186:1518-30.
  38. **Ferech, M., S. Coenen, S. Malhotra-Kumar, K. Dvorakova, E. Hendrickx, C. Suetens, and H. Goossens.** 2006. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient antibiotic use in Europe. *J Antimicrob Chemother* 58:401-7.
  39. **Fiebelkorn, K. R., S. A. Crawford, M. L. McElmeel, and J. H. Jorgensen.** 2003. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 41:4740-4.
  40. **Fluit, A. C., C. L. Wielders, J. Verhoef, and F. J. Schmitz.** 2001. Epidemiology and susceptibility of 3,051 *Staphylococcus aureus* isolates from 25 university hospitals participating in the European SENTRY study. *J Clin Microbiol* 39:3727-32.
  41. **Fowler, V. G., Jr., J. Li, G. R. Corey, J. Boley, K. A. Marr, A. K. Gopal, L. K. Kong, G. Gottlieb, C. L. Donovan, D. J. Sexton, and T. Ryan.** 1997. Role of echocardiography in evaluation of patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia: experience in 103 patients. *J Am Coll Cardiol* 30:1072-8.
  42. **Fridkin, S. K., J. C. Hageman, M. Morrison, L. T. Sanza, K. Como-Sabetti, J. A. Jernigan, K. Harriman, L. H. Harrison, R. Lynfield, and M. M. Farley.** 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *N Engl J Med* 352:1436-44.
  43. **Friedland, I. R., J. du Plessis, and A. Cilliers.** 1995. Cardiac complications in children with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Pediatr* 127:746-8.
  44. **Gillet, Y., B. Issartel, P. Vanhems, J. C. Fournet, G. Lina, M. Bes, F. Vandenesch, Y. Piemont, N. Brousse, D. Floret, and J. Etienne.** 2002. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 359:753-759.
  45. **Gillet, Y., P. Vanhems, G. Lina, M. Bes, F. Vandenesch, D. Floret, and J. Etienne.** 2007. Factors predicting mortality in necrotizing community-acquired

pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* containing Pantone-Valentine leukocidin. Clin Infect Dis 45:315-21.

46. **Gomes, A. R., S. Vinga, M. Zavolan, and H. de Lencastre.** 2005. Analysis of the genetic variability of virulence-related loci in epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 49:366-79.
47. **Gonzalez, B. E., G. Martinez-Aguilar, K. G. Hulten, W. A. Hammerman, J. Coss-Bu, A. Avalos-Mishaan, E. O. Mason, Jr., and S. L. Kaplan.** 2005. Severe Staphylococcal sepsis in adolescents in the era of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Pediatrics 115:642-8.
48. **Gonzalez, C., M. Rubio, J. Romero-Vivas, M. Gonzalez, and J. J. Picazo.** 1999. Bacteremic pneumonia due to *Staphylococcus aureus*: A comparison of disease caused by methicillin-resistant and methicillin-susceptible organisms. Clin Infect Dis 29:1171-7.
49. **Gordon, R. J., and F. D. Lowy.** 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clin Infect Dis 46 Suppl 5:S350-9.
50. **Grayson, M. L.** 2006. The treatment triangle for staphylococcal infections. N Engl J Med 355:724-7.
51. **Grimprel, E., M. Lorrot, H. Haas, D. Pinquier, N. Perez, A. Ferroni, and R. Cohen.** 2008. [Osteoarticular infections: therapeutic proposals of the Paediatric Infectious Diseases Group of the French Society of Paediatrics (GPIP)]. Arch Pediatr 15 Suppl 2:S74-80.
52. **Hallin, M., A. Deplano, O. Denis, R. De Mendonca, R. De Ryck, and M. J. Struelens.** 2007. Validation of pulsed-field gel electrophoresis and spa typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. J Clin Microbiol 45:127-33.
53. **Health, M. D. o.** 2004. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota, p. 61-72, Minnesota Department of Health Disease Control Newsletter, vol. 32.
54. **Healy, C. M., K. G. Hulten, D. L. Palazzi, J. R. Campbell, and C. J. Baker.** 2004. Emergence of new strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a neonatal intensive care unit. Clin Infect Dis 39:1460-6.
55. **Hedrick, J.** 2003. Acute bacterial skin infections in pediatric medicine: current issues in presentation and treatment. Paediatr Drugs 5 Suppl 1:35-46.
56. **Hendren, W. H., 3rd, and R. J. Haggerty.** 1958. Staphylococcal pneumonia in infancy and childhood; analysis of seventy-five cases. J Am Med Assoc 168:6-16.
57. **Herold, B. C., L. C. Immergluck, M. C. Maranan, D. S. Lauderdale, R. E. Gaskin, S. Boyle-Vavra, C. D. Leitch, and R. S. Daum.** 1998. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. Jama 279:593-598.
58. **Holmes, A., M. Ganner, S. McGuane, T. L. Pitt, B. D. Cookson, and A. M. Kearns.** 2005. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Pantone-Valentine

- leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. *J Clin Microbiol* 43:2384-90.
59. **Hyun, D. Y., E. O. Mason, A. Forbes, and S. L. Kaplan.** 2009. Trimethoprim-sulfamethoxazole or clindamycin for treatment of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections. *Pediatr Infect Dis J* 28:57-9.
  60. **Jackson, M.** 2009. Bacterial skin infections, p. 784-794. *In* R. D. Feigin (ed.), *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, vol. 1. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA.
  61. **Kaplan, S., Hulten, KG, Mason, EO.** 2009. *Staphylococcus aureus* infections, p. 1197-1213. *In* S. Elsevier (ed.), *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, 6th ed, vol. 1. Feigin, R, Philadelphia, PA.
  62. **Kaplan, S. L.** 2009. Challenges in the evaluation and management of bone and joint infections and the role of new antibiotics for gram positive infections. *Adv Exp Med Biol* 634:111-20.
  63. **Kaplan, S. L.** 2006. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children. *Semin Pediatr Infect Dis* 17:113-9.
  64. **Kaplan, S. L.** 2005. Implications of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a community-acquired pathogen in pediatric patients. *Infect Dis Clin North Am* 19:747-57.
  65. **Kaplan, S. L.** 2005. Treatment of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Pediatr Infect Dis J* 24:457-8.
  66. **Kaplan, S. L., J. G. Deville, R. Yogev, M. R. Morfin, E. Wu, S. Adler, B. Edge-Padbury, S. Naberhuis-Stehouwer, and J. B. Bruss.** 2003. Linezolid versus vancomycin for treatment of resistant Gram-positive infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 22:677-86.
  67. **Kaplan, S. L., K. G. Hulten, B. E. Gonzalez, W. A. Hammerman, L. Lamberth, J. Versalovic, and E. O. Mason, Jr.** 2005. Three-year surveillance of community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in children. *Clin Infect Dis* 40:1785-1791.
  68. **Kisich, K. O., C. W. Carspecken, S. Fieve, M. Boguniewicz, and D. Y. Leung.** 2008. Defective killing of *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis is associated with reduced mobilization of human beta-defensin-3. *J Allergy Clin Immunol* 122:62-8.
  69. **Kloos WE, B. T.** 1999. *Staphylococcus* and *Micrococcus*, p. 262-282. *In* P. Murray, Baron, EJ, Pfaller MA, Tenover MC, Tenover RH (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 5 th ed. Mosby Washington DC.
  70. **Krogstad, P.** 2009. Septic arthritis, p. 742-748. *In* R. D. Feigin (ed.), *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, 6 ed, vol. 1. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA.
  71. **Labandeira-Rey, M., F. Couzon, S. Boisset, E. L. Brown, M. Bes, Y. Benito, E. M. Barbu, V. Vazquez, M. Hook, J. Etienne, F. Vandenesch, and M. G.**

- Bowden.** 2007. *Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* 315:1130-1133.
72. **Le, J., and J. M. Lieberman.** 2006. Management of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children. *Pharmacotherapy* 26:1758-70.
  73. **Leclercq, R., and P. Courvalin.** 1991. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother* 35:1267-72.
  74. **Lee, G. M., S. S. Huang, S. L. Rifas-Shiman, V. L. Hinrichsen, S. I. Pelton, K. Kleinman, W. P. Hanage, M. Lipsitch, A. J. McAdam, and J. A. Finkelstein.** 2009. Epidemiology and risk factors for *Staphylococcus aureus* colonization in children in the post-PCV7 era. *BMC Infect Dis* 9:110.
  75. **Lee, J. C.** 1996. The prospects for developing a vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 4:162-6.
  76. **Lee, M. C., A. M. Rios, M. F. Aten, A. Mejias, D. Cavuoti, G. H. McCracken, Jr., and R. D. Hardy.** 2004. Management and outcome of children with skin and soft tissue abscesses caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pediatr Infect Dis J* 23:123-7.
  77. **Lee, S. M., M. Ender, R. Adhikari, J. M. Smith, B. Berger-Bachi, and G. M. Cook.** 2007. Fitness cost of staphylococcal cassette chromosome mec in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by way of continuous culture. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1497-9.
  78. **Levy, M. M., M. P. Fink, J. C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S. M. Opal, J. L. Vincent, and G. Ramsay.** 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 31:1250-1256.
  79. **Lina, G., Y. Piemont, F. Godail-Gamot, M. Bes, M. O. Peter, V. Gauduchon, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 1999. Involvement of Pantón-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 29:1128-1132.
  80. **Lowy, F. D.** 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 111:1265-73.
  81. **Lowy, F. D.** 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339:520-32.
  82. **Maguire, G. P., A. D. Arthur, P. J. Boustead, B. Dwyer, and B. J. Currie.** 1998. Clinical experience and outcomes of community-acquired and nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a northern Australian hospital. *J Hosp Infect* 38:273-81.
  83. **Manzur, A., A. M. Dominguez, M. Pujol, M. P. Gonzalez, E. Limon, A. Hornero, R. Martin, F. Gudiol, and J. Ariza.** 2008. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: an emerging threat in Spain. *Clin Microbiol Infect* 14:377-80.

84. **Marrack, P., and J. Kappler.** 1990. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 248:705-11.
85. **Martinez-Aguilar, G., A. Avalos-Mishaan, K. Hulten, W. Hammerman, E. O. Mason, Jr., and S. L. Kaplan.** 2004. Community-acquired, methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 23:701-6.
86. **McCaig, L. F., L. C. McDonald, S. Mandal, and D. B. Jernigan.** 2006. *Staphylococcus aureus*-associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. *Emerg Infect Dis* 12:1715-23.
87. **McCaskill, M. L., E. O. Mason, Jr., S. L. Kaplan, W. Hammerman, L. B. Lamberth, and K. G. Hulten.** 2007. Increase of the USA300 clone among community-acquired methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* causing invasive infections. *Pediatr Infect Dis J* 26:1122-7.
88. **McDougal, L. K., C. D. Steward, G. E. Killgore, J. M. Chaitram, S. K. McAllister, and F. C. Tenover.** 2003. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol* 41:5113-20.
89. **Milheirico, C., D. C. Oliveira, and H. de Lencastre.** 2007. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3374-7.
90. **Millar, B. C., A. Loughrey, J. S. Elborn, and J. E. Moore.** 2007. Proposed definitions of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *J Hosp Infect* 67:109-13.
91. **Miller, L. G., and S. L. Kaplan.** 2009. *Staphylococcus aureus*: a community pathogen. *Infect Dis Clin North Am* 23:35-52.
92. **Miller, L. G., F. Perdreau-Remington, A. S. Bayer, B. Diep, N. Tan, K. Bharadwa, J. Tsui, J. Perlroth, A. Shay, G. Tagudar, U. Ibebuogu, and B. Spellberg.** 2007. Clinical and epidemiologic characteristics cannot distinguish community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection from methicillin-susceptible *S. aureus* infection: a prospective investigation. *Clin Infect Dis* 44:471-82.
93. **Moran, G. J., A. Krishnadasan, R. J. Gorwitz, G. E. Fosheim, L. K. McDougal, R. B. Carey, and D. A. Talan.** 2006. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med* 355:666-74.
94. **Morgan, M. S.** 2007. Diagnosis and treatment of Panton-Valentine leukocidin (PVL)-associated staphylococcal pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 30:289-96.
95. **Moulin, F., B. Quinet, J. Raymond, Y. Gillet, and R. Cohen.** 2008. [Managing children skin and soft tissue infections]. *Arch Pediatr* 15 Suppl 2:S62-7.

96. **Murchan, S., M. E. Kaufmann, A. Deplano, R. de Ryck, M. Struelens, C. E. Zinn, V. Fussing, S. Salmenlinna, J. Vuopio-Varkila, N. El Solh, C. Cuny, W. Witte, P. T. Tassios, N. Legakis, W. van Leeuwen, A. van Belkum, A. Vindel, I. Laconcha, J. Garaizar, S. Haeggman, B. Olsson-Liljequist, U. Ransjo, G. Coombes, and B. Cookson.** 2003. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol* 41:1574-85.
97. **Naimi, T. S., K. H. LeDell, D. J. Boxrud, A. V. Groom, C. D. Steward, S. K. Johnson, J. M. Besser, C. O'Boyle, R. N. Danila, J. E. Cheek, M. T. Osterholm, K. A. Moore, and K. E. Smith.** 2001. Epidemiology and clonality of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota, 1996-1998. *Clin Infect Dis* 33:990-6.
98. **Nakaminami, H., N. Noguchi, M. Ikeda, M. Hasui, M. Sato, S. Yamamoto, T. Yoshida, T. Asano, M. Senoue, and M. Sasatsu.** 2008. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibilities of 273 exfoliative toxin-encoding-gene-positive *Staphylococcus aureus* isolates from patients with impetigo in Japan. *J Med Microbiol* 57:1251-8.
99. **Nathwani, D., M. Morgan, R. G. Masterton, M. Dryden, B. D. Cookson, G. French, and D. Lewis.** 2008. Guidelines for UK practice for the diagnosis and management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections presenting in the community. *J Antimicrob Chemother* 61:976-94.
100. **Navarro, M. B., B. Huttner, and S. Harbarth.** 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* control in the 21st century: beyond the acute care hospital. *Curr Opin Infect Dis* 21:372-9.
101. **NCCLS, C. a. L. S. I.** 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing; 18th Informational Supplement. M100S18; Clinical and Laboratory Standards Institute; Wayne, PA.
102. **Oliveira, D. C., C. Milheirico, S. Vinga, and H. de Lencastre.** 2006. Assessment of allelic variation in the *ccrAB* locus in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *J Antimicrob Chemother* 58:23-30.
103. **Ossowski, K., R. H. Chun, D. Suskind, and F. M. Baroody.** 2006. Increased isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pediatric head and neck abscesses. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132:1176-81.
104. **Pallin, D. J., D. J. Egan, A. J. Pelletier, J. A. Espinola, D. C. Hooper, and C. A. Camargo, Jr.** 2008. Increased US emergency department visits for skin and soft tissue infections, and changes in antibiotic choices, during the emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Emerg Med* 51:291-8.
105. **Pannaraj, P. S., K. G. Hulten, B. E. Gonzalez, E. O. Mason, Jr., and S. L. Kaplan.** 2006. Infective pyomyositis and myositis in children in the era of community-acquired, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 43:953-60.

106. **Patti, J. M., B. L. Allen, M. J. McGavin, and M. Hook.** 1994. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 48:585-617.
107. **Peacock, S. J., C. E. Moore, A. Justice, M. Kantzanou, L. Story, K. Mackie, G. O'Neill, and N. P. Day.** 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 70:4987-4996.
108. **Peltola, H., L. Unkila-Kallio, and M. J. Kallio.** 1997. Simplified treatment of acute staphylococcal osteomyelitis of childhood. The Finnish Study Group. *Pediatrics* 99:846-850.
109. **Prevost, G., P. Couppie, P. Prevost, S. Gayet, P. Petiau, B. Cribier, H. Monteil, and Y. Piemont.** 1995. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J Med Microbiol* 42:237-245.
110. **Robert, J., J. Etienne, and X. Bertrand.** 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Pantone-Valentine leukocidin in a retrospective case series from 12 French hospital laboratories, 2000-2003. *Clin Microbiol Infect* 11:585-587.
111. **Rossney, A. S., P. McDonald, H. Humphreys, G. M. Glynn, and C. T. Keane.** 2003. Antimicrobial resistance and epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Ireland (North and South), 1999. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22:379-81.
112. **Ruhe, J. J., N. Smith, R. W. Bradsher, and A. Menon.** 2007. Community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft-tissue infections: impact of antimicrobial therapy on outcome. *Clin Infect Dis* 44:777-84.
113. **Sá-Leão, R., I. S. Sanches, I. Couto, C. R. Alves, and H. de Lencastre.** 2001. Low prevalence of methicillin-resistant strains among *Staphylococcus aureus* colonizing young and healthy members of the community in Portugal. *Microb Drug Resist* 7:237-245.
114. **Sá-Leão, R., I. Santos Sanches, D. Dias, I. Peres, R. M. Barros, and H. de Lencastre.** 1999. Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain? *J Clin Microbiol* 37:1913-1920.
115. **Sabol, K. E., K. L. Echevarria, and J. S. Lewis, 2nd.** 2006. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: new bug, old drugs. *Ann Pharmacother* 40:1125-33.
116. **Sakoulas, G., H. S. Gold, L. Venkataraman, P. C. DeGirolami, G. M. Eliopoulos, and Q. Qian.** 2001. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. *J Clin Microbiol* 39:3946-51.

117. **Salgado, C. D., B. M. Farr, and D. P. Calfee.** 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis* 36:131-9.
118. **Sattler, C., Armando, GC.** 2004. Coagulase-positive *Staphylococcal* infections (*Staphylococcus aureus*), p. 1099-1128. In C. J. Feigin RD, Demmler GJ, Kaplan SL (ed.), *Textbook of Pediatric Infectious Diseases.*, 5 ed, vol. 1. Saunders, Philadelphia.
119. **Sattler, C. A., E. O. Mason, Jr., and S. L. Kaplan.** 2002. Prospective comparison of risk factors and demographic and clinical characteristics of community-acquired, methicillin-resistant versus methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infection in children. *Pediatr Infect Dis J* 21:910-7.
120. **Schmitz, F. J., R. Sadurski, A. Kray, M. Boos, R. Geisel, K. Kohrer, J. Verhoef, and A. C. Fluit.** 2000. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *J Antimicrob Chemother* 45:891-4.
121. **Schneider-Lindner, V., J. A. Delaney, S. Dial, A. Dascal, and S. Suissa.** 2007. Antimicrobial drugs and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 13:994-1000.
122. **Schramm, G. E., J. A. Johnson, J. A. Doherty, S. T. Micek, and M. H. Kollef.** 2006. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sterile-site infection: The importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Crit Care Med* 34:2069-74.
123. **Shopsin, B., M. Gomez, S. O. Montgomery, D. H. Smith, M. Waddington, D. E. Dodge, D. A. Bost, M. Riehman, S. Naidich, and B. N. Kreiswirth.** 1999. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 37:3556-63.
124. **Shulman, S. T., and E. M. Ayoub.** 1976. Severe staphylococcal sepsis in adolescents. *Pediatrics* 58:59-66.
125. **Silva-Costa, C., F. R. Pinto, M. Ramirez, and J. Melo-Cristino.** 2008. Decrease in macrolide resistance and clonal instability among *Streptococcus pyogenes* in Portugal. *Clin Microbiol Infect* 14:1152-9.
126. **Stevens, D. L., Y. Ma, D. B. Salmi, E. McIndoo, R. J. Wallace, and A. E. Bryant.** 2007. Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 195:202-11.
127. **Swenson, J. M., and F. C. Tenover.** 2005. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus spp.* *J Clin Microbiol* 43:3818-23.
128. **Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33:2233-2239.



129. **Tenover, F. C., L. K. McDougal, R. V. Goering, G. Killgore, S. J. Projan, J. B. Patel, and P. M. Dunman.** 2006. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. *J Clin Microbiol* 44:108-18.
130. **Vandenesch, F., T. Naimi, M. C. Enright, G. Lina, G. R. Nimmo, H. Heffernan, N. Liassine, M. Bes, T. Greenland, M. E. Reverdy, and J. Etienne.** 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 9:978-984.
131. **von Eiff, C., K. Becker, K. Machka, H. Stammer, and G. Peters.** 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med* 344:11-6.
132. **Voyich, J. M., K. R. Braughton, D. E. Sturdevant, A. R. Whitney, B. Said-Salim, S. F. Porcella, R. D. Long, D. W. Dorward, D. J. Gardner, B. N. Kreiswirth, J. M. Musser, and F. R. DeLeo.** 2005. Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *J Immunol* 175:3907-19.
133. **Waldvogel, F.** 2000. *Staphylococcus aureus*, p. 2069-2079, Mandell, Douglas, and Bennett's Principles & Practice of Infectious Diseases vol. 2. Churchill livingstone, philadelphia, PA.
134. **Ward, P. D., and W. H. Turner.** 1980. Identification of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin as a potent dermonecrotic toxin. *Infect Immun* 28:393-7.
135. **WCDH, D.** 2005. Community-associated MRSA infection surveillance in Washoe County final report for health care providers. *Epi-News* 25:1-6.
136. **Wertheim, H. F., D. C. Melles, M. C. Vos, W. van Leeuwen, A. van Belkum, H. A. Verbrugh, and J. L. Nouwen.** 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5:751-62.
137. **Witte, W., B. Strommenger, C. Cuny, D. Heuck, and U. Nuebel.** 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the Panton-Valentine leucocidin gene in Germany in 2005 and 2006. *J Antimicrob Chemother* 60:1258-63.
138. **Zinderman, C. E., B. Conner, M. A. Malakooti, J. E. LaMar, A. Armstrong, and B. K. Bohnker.** 2004. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among military recruits. *Emerg Infect Dis* 10:941-4.